

**IN VIVO WIRKUNG DES ANTIBIOTIKUMS PACTAMYCIN
AUF DAS PROTEINBIOSYNTHESE-SYSTEM
DER RATTENLEBER**

von
Marianne Françoise Fey
aus
Avignon

1974 № 384



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543101_0004

**IN VIVO WIRKUNG DES ANTIBIOTIKUMS PACTAMYCIN
AUF DAS PROTEINBIOSYNTHESE-SYSTEM
DER RATTENLEBER**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von
Marianne Françoise Fey
aus
Avignon

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 31. 7. 1974

Dekan:	Prof. Dr. J. Christiansen
Erstberichterstatter:	Prof. Dr. H. Kersten
Zweitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Remmert

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für
Physiologische Chemie der Universität
Erlangen-Nürnberg durchgeführt.

Frau Professor Dr. Helga Kersten danke ich sehr herzlich für
die Überlassung des Themas, für die ständige Hilfe bei der
Durchführung der Versuche und für die wohlwollend kritische
Durchsicht des Manuskripts.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Walter Kersten für
seine stets freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Frau und Herrn Böcker, sowie Frau Kischka und Herrn Raettig
danke ich für die Mithilfe bei einigen Experimenten.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Antibiotikum Pactamycin und sein Einfluß auf die Regulation des Zellmetabolismus	1
1.2 Klinischer Aspekt der Fragestellung	3
1.3 Eigenschaften von Pactamycin	4
1.3.1 Wirkung auf das Zellwachstum	4
1.3.2 Hemmung der Proteinsynthese	5
1.3.3 Wechselwirkung mit Ribosomen	6
1.3.3.1 Bindung an Ribosomen und Ribosomen-Untereinheiten	6
1.3.3.2 Hemmeffekte am Prokaryonten-Ribosom	7
1.3.3.3 Hemmeffekte am Eukaryonten-Ribosom	8
1.4 Nebenwirkungen von Pactamycin	9
1.4.1 Synthese von DNA und RNA	9
1.4.2 Methylierung von rRNA und tRNA	10
1.5 Ziele dieser Arbeit	10
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Material	11
2.1.1 Biologisches Material	11
2.1.2 Technisches Material	11
2.1.3 Chemikalien	12
2.2 Methoden	14
2.2.1 Hemmversuche mit Bacillus subtilis	14
2.2.2 Antibiotika-Behandlung der Ratten und Präparation von Rattenleber	15
2.2.3 Präparation der Leber tRNA	16
2.2.4 Präparation der Ribosomen-Polysomen-Fraktion	22

	<u>Seite</u>
2.2.5 Sedimentation in einem stabilisierten Zuckergradienten	24
2.2.6 Präparation der S100-Roh-Enzymfraktion	25
2.2.7 Präparation der "pH 5 Enzymfraktion"	25
2.2.8 Testsysteme	27
2.2.8.1 Akzeptoraktivität der tRNA	27
2.2.8.2 Zellfreie Peptidsynthese	31
2.2.8.3 In vitro Methylierung der tRNA	36
2.2.8.4 Auswertung der Ergebnisse	38
 3. RESULTATE	 40
3.1 Vorversuche	40
3.1.1 Überprüfung der Pactamycincharge	40
3.1.2 Bedingungen für das zellfreie System der Peptidsynthese aus Rattenleber	43
3.1.2.1 Enzymkonzentration	43
3.1.2.2 Ribosomenkonzentration	44
3.1.2.3 Substratkonzentration	47
3.1.2.4 tRNA-Konzentration	51
3.1.2.5 Mg-Konzentration	53
3.1.3 Der Akzeptoraktivitätstest für tRNA aus Rattenleber	57
 3.2 Hauptversuche: Einfluß von Pactamycin auf die Komponenten der proteinsynthetisierenden Machinerie in Rattenleber	 58
3.2.1 Die Aktivität der Ribosomen-Polysomen- Fraktion	58
3.2.2 Diskussion der Resultate	65
3.2.3 Transferribonucleinsäuren aus mit Pactamycin behandelten Tieren (Resultate und Diskussion)	70
3.2.3.1 Vorbemerkungen	70
3.2.3.2 tRNA-Ausbeuten	73

	<u>Seite</u>
3.2.3.3 Akzeptoraktivität der tRNA	77
3.2.3.4 Die Methylierbarkeit der tRNA	82
3.2.3.5 Das chromatographische Verhalten der tRNA	86
4. ZUSAMMENFASSUNG	89
a) Ribosomen	89
b) Transferribonucleinsäuren	90
5. LITERATUR	91

1. EINLEITUNG

1.1 Das Antibiotikum Pactamycin und sein Einfluß auf die Regulation des Zellmetabolismus

Wie viele andere Hemmstoffe so ist auch das Antibiotikum Pactamycin in doppelter Hinsicht interessant. Es ist als Zytostatikum in der Tumorthherapie erprobt worden (EVANS et al. 1965). In der Biochemie dient es in der experimentellen Grundlagenforschung zur Aufklärung zellulärer Synthese und Regulationsmechanismen. Das Interesse an diesem Inhibitor der Proteinbiosynthese lag hauptsächlich auf diesem Aspekt. Das Thema enthält jedoch auch eine Komponente praktisch-klinischen Interesses im Zusammenhang mit der Suche nach frühen diagnostischen Tests auf die maligne Transformation von Geweben.

Das Studium von molekularen Mechanismen für die Regulationsprozesse des Zellstoffwechsels ist neben der Aufklärung der am Stoffwechsel beteiligten Komponenten ein zentrales Thema der heutigen Biochemie und Molekularbiologie. Aktuelle Fragenkomplexe wie die der "Differenzierung" und der "Oncogenese" setzen die Erforschung von Regulationsmechanismen in den Syntheseleistungen von Zellen und Zellverbänden voraus.

In den Arbeitsgruppen W. u. H. KERSTEN werden Regulationsmechanismen zwischen Protein- und Ribonucleinsäure (RNA)-Synthese in Prokaryonten- und Eukaryontenzellen untersucht. Ein Eingriff in den Metabolismus der Proteine (Aushungern der Zellen durch Aminosäuremangel oder Hemmung der Protein-synthese durch Antibiotika) wirkt sich auch auf den RNA-Metabolismus aus. Umgekehrt könnten quantitative oder qualitative Änderungen in neu synthetisierter RNA die Art und Menge neu zu synthetisierender Proteine steuern. Für einen Teilbereich ist diese Hypothese bereits verifiziert, den Zusammenhang des Metabolismus der instabilen messenger RNA (mRNA) und der Proteinbiosynthese. Ob auch ein Zusammenhang

besteht zwischen der Synthese von Proteinen und stabilen RNA-Typen wie rRNA (ribosomale RNA) und tRNA (transfer RNA) ist noch nicht geklärt. In dieser Arbeit lautete die Frage:

- a) Spielen Modifikationen an der tRNA oder der rRNA eine Rolle in der Regulation der Proteinsynthese?
oder
- b) Beeinflußt eine Hemmung der Proteinsynthese die Art und Menge der neu synthetisierten tRNA und rRNA-Typen?

Es gibt bereits Resultate, die auf die Existenz regulatorischer Zusammenhänge zwischen der Synthese stabiler RNA-Typen und Proteinsynthese hinweisen. In Bakterien gibt es die sogenannte strenge Kontrolle (stringent control). Diese Kontrolle besteht darin, daß bei Aminosäuremangel in für Aminosäuren auxotrophen Bakterien die Synthese von Proteinen und damit gekoppelt auch die Synthese von Ribonucleinsäuren aufhört. Diese Kontrolle beruht auf dem Vorhandensein des sogenannten *rel* genes. In *rel*⁻ Mutanten wird auch bei Aminosäuremangel weiter RNA synthetisiert. Anstatt durch Aminosäuremangel kann die strenge Kontrolle in Wild-Stämmen auch ausgelöst werden durch bestimmte Chinone, die die Aminoacylierung von tRNA hemmen (OGILVIE, WIEBAUER, KERSTEN). Andererseits kann durch Ribosomeninhibitoren diese strenge Kontrolle aufgehoben werden. (ARONSON und SPIEGELMANN, 1961, SOWAKA und KAZIRO, 1968 und 1969). Frühere Resultate der Gruppe H. u. W. KERSTEN zeigen, daß bei Microorganismen auch unter dem Einfluß von Pactamycin die Proteinsynthese gehemmt und stabile RNA-Typen weiter produziert werden. Diese RNA-Typen unterscheiden sich von normaler RNA dadurch, daß sie nicht mehr korrekt modifiziert sind. Zahlreiche tRNA species sind methylgruppen-defizient (H.H.ARNOLD, H.KERSTEN, 1973), auch die ribosomale RNA ist untermethyliert (DUBIN, 1967).

Auch in höheren Organismen geschieht die Bildung von RNA in mehreren Stufen, die wir einteilen in a) Transcription und b) Reifungsprozeß. Während des Reifungsprozesses werden die

transkribierten RNA-Moleküle durch Nucleasen in die richtige Größe geschnitten (processing). Die RNA Maturation wird schließlich durch Modifikation der Nucleosidreste vervollständigt.

Wir haben in der vorliegenden Arbeit versucht zu klären ob es analog zu der Situation bei Microorganismen auch in höheren Organismen eine strenge Kontrolle zwischen RNA und Proteinsynthese gibt und ob nach Behandlung von Tieren mit dem Proteinsynthesehemmstoff Pactamycin auch in höheren Organismen methylgruppen-defiziente tRNA-species entstehen.

1.2 Klinischer Aspekt der Fragestellung:

Es fehlt in der Literatur nicht an experimentellen Resultaten, die darauf hinweisen, daß in verschiedenen Tumorgeweben Art oder Menge, jedenfalls die Gesamtaktivität der tRNA-Methylasen (tRNA-methylierende Enzyme) verändert sind. (BOREK und KERR, 1972, Übersichtsarbeit). Sollte veränderte Methylaseaktivität ein früh auftretendes, signifikantes Charakteristikum von Tumorgewebe sein, so ließe sich diese Eigenschaft ohne Zweifel zu einem Suchtest, also zur Frühdiagnose von Tumoren ausnützen. Dies aber ist von klinischem Interesse, da viele Typen von lokalisierten Tumoren rechtzeitig entfernt werden könnten, wenn sie nur früh genug diagnostiziert werden könnten. Leider fehlt es derzeit noch an solchen frühdiagnostischen Tests und es wird gegenwärtig sehr intensiv danach gesucht.

Der Grund, weshalb ein tRNA-Methylase-Test noch nicht weiter ausgebaut werden konnte, ist möglicherweise darin zu suchen, daß bisher ein passendes homologes Substrat zur Messung dieser Enzymaktivitäten fehlte. Da bisher keine tRNA aus Eukaryontenzellen bekannt war, die in einem homologen Enzymtest mit Eukaryonten-tRNA-Methylasen signifikante Mengen an Methylgruppen nachträglich akzeptierte, wurden die Enzymaktivitäten aus Tumorgeweben bisher im heterologen Test mit methylgruppen-defizienten tRNA-species aus Bakterien als Substrat gemessen.

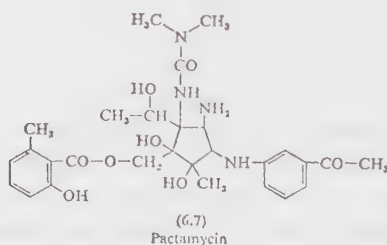
(Diese methylgruppenarme tRNA wird gewonnen aus einer E. coli Mutante $rel^- met^{*-}$, in der bei Methioninmangel nahezu völlig methylgruppen-defiziente tRNAs synthetisiert werden. Die erhöhte Methylase-Aktivität in Tumoren mit diesem falschen Substrat sind mit großer Vorsicht aufzunehmen, da tRNA-Methylasen mit dem Substrat aus Prokaryonten andere und zusätzliche Seiten erkennen und methylieren könnten, als im homologen Substrat. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die für die Tumorgewebe gemessenen erhöhten Methylase-Aktivitäten sich zumindest zum Teil als Artefakte herausstellen, wenn man die Messungen mit einem passenden homologen Substrat wiederholen könnte.

Sollte sich tatsächlich in Analogie zu der Situation bei Prokaryonten ergeben, daß nach Pactamycin-Behandlung auch in Eukaryontenzellen untermethylierte tRNA-species auftreten, so wäre damit das dringend erforderliche Substrat für tRNA-Methylasetests aus Tumorgeweben verfügbar.

1.3 Eigenschaften von Pactamycin

1.3.1 Wirkung auf das Zellwachstum

Das Antibiotikum Pactamycin wird produziert von *Streptomyces pactum* var. *pactum*. Sein Molekulargewicht ist 560 dal. Seine Strukturformel ist in der folgenden Abbildung angeführt.



Die Substanz hemmt das Wachstum von verschiedenen Bakterien in geringen Konzentrationen. Einige Werte minimaler Hemmkonzentrationen (MHK) in $\mu\text{g/ml}$ sind:

0.8 für *B. subtilis* und *Klebsellia pneumoniae*, 0.2 für *Staphylococcus aureus* (alle gram-positiv). 6.5 für *E.coli* und 110 für *Proteus vulgaris* (beide gram - negativ).

Die für ein in der Humanmedizin zu verwendendes Antibiotikum unerläßliche Voraussetzung: "geringe Hemmeffekte auf das Wachstum von Zellen des Wirtsorganismus" ist für dieses Antibiotikum dagegen nicht so gut erfüllt wie für andere typische "große" Antibiotika. Menschliche KB-Zellen in Kultur (von einem Epidermis-Karzinom abgeleitete Zelllinie) zeigen eine 50% Wachstumshemmung bereits bei zwanzigfach niedrigeren Konzentrationen als die für *B. subtilis* oben genannten, nämlich bei 0.01 µg/ml. (BHUYAN, 1965a). Da uns keine Hemmdaten aus menschlichen Primärkulturen nicht-kanzerösen Ursprungs zum Vergleich zugänglich waren, können wir nicht ermesen, ob es sich bei diesen Angaben nicht um einen präferentiellen Effekt auf maligne transformierte Zellen handelt. Als Hinweis auf einen solchen Effekt könnte der Befund gedeutet werden, daß die Substanz bei Mäusen und Hamstern in vivo gegen viele Typen von Tumoren aktiv ist. (BHUYAN, 1967). Die Resultate einer klinischen Testreihe als Antitumorigens bei menschlichen Krebspatienten (EVANS et al., 1965) liegen uns ebenfalls nicht vor. In der allgemeinen Humantherapie findet die Substanz jedoch keine breite Verwendung, da sie zu toxisch ist.

1.3.2 Hemmung der Proteinsynthese

Nach den Postulaten von F.HAHN (1967) ist als Angriffsort eines Antibiotikums diejenige Funktion zu bezeichnen, die bei der niedrigsten Hemmstoffkonzentration bereits gehemmt wird, wenn alle anderen Funktionen noch weitgehend ungestört ablaufen können. Nach diesem Kriterium kann als primärer Angriffsort des Pactamycins sehr deutlich die Proteinsynthese identifiziert werden. Pactamycin in einer Konzentration von 0.1 µg/ml hemmt in einer Suspensionskultur von KB-Zellen die Proteinsynthese bereits zu 94%, während die DNA und RNA-Synthese bei dieser

Konzentration nur zu 39% bzw. 18% gehemmt werden (BHUYAN, 1965a). Bei noch niedrigeren Konzentrationen (0.04 μ g/ml) wird die Proteinsynthese bereits innerhalb von 5 min zu 40% gehemmt, während zu einem so frühen Zeitpunkt noch keine Hemmung der DNA und RNA-Synthese nachzuweisen ist. Wie bei anderen Hemmstoffen werden bei höheren Konzentrationen auch andere Mechanismen als die Proteinsynthese betroffen. Aber es ist schwierig zu entscheiden ob es sich hier unabhängig um weitere direkte Angriffspunkte des Antibiotikums handelt oder um Sekundäreffekte der Hemmung der Proteinsynthese.

Die Identifizierung der Proteinsynthese als primärem Angriffsort wird weiter bestätigt durch die Befunde, daß auch zellfreie Systeme zur Peptidsynthese sowohl von Pro- als auch von Eukaryonten durch Pactamycinkonzentrationen von der Größenordnung der MHK gehemmt werden können.

1.3.3 Wechselwirkung mit Ribosomen

In einem Ausschlußverfahren wurde zunächst demonstriert, daß durch Pactamycin weder die Aktivierung der Aminosäuren betroffen wird (BHUYAN, 1965b) noch die Aminoacylierung der tRNA (COLOMBO et al., 1966). FELICETTI et al. (1966) konnten direkt zeigen, daß Retikulozyten-Ribosomen, nicht aber die Überstandsfaktoren, durch eine Inkubation mit Pactamycin inaktiviert werden. Damit liegt der Zielpunkt der Pactamycin-Wirkung in der komplexen Machinerie der Proteinsynthese am Ribosom.

1.3.3.1 Bindung an Ribosomen und Ribosomen-Untereinheiten

Bindungsstudien der Gruppe GOLDBERG (Zusammenfassung und Literatur in der Monographie von GALE, CUNDLIFFE, REYNOLDS, RICHMOND und WARING, 1972) zeigen, daß bei niedrigen Temperaturen (0°C) Pactamycin vorzüglich an die kleine Ribosomenuntereinheit (30 S bzw. 40 S) bindet. Ebenfalls wurde Bindung an 80 S Monosomen aus Kaninchen-Retikulozyten unter diesen Bedingungen gefunden, aber keine Bindung an die größere Ribosomenuntereinheit (50 S bzw. 60 S).

Bei höheren Temperaturen (37°C) liegen die Verhältnisse komplizierter. Jetzt findet man z.B. auch Bindung von Pactamycin an Reticulozyten-Polysomen, was bei 0°C nicht gefunden wird. Das Ausmaß der Bindung hängt von mehreren Faktoren ab. Dazu gehören außer der Temperatur noch die Konzentration an Magnesium und anderen Kationen wie Ammonium, Gegenwart von tRNA, mRNA Überstandsfaktoren, GTP, Spermidine und schließlich auch die freie Antibiotikakonzentration im umgebenden Milieu. Es ist daher wenig sinnvoll, unter simplifizierenden Bedingungen gemessene Bindungskonstanten anzugeben. Als Anhaltspunkt kann jedoch folgendes experimentelle Resultat dienen: nach Inkubation isolierter Ribosomen in einer Pactamycinlösung von einer Konzentration in der Größenordnung der minimalen Hemmkonzentration bleiben trotz nachfolgender Alkoholfällung oder Zuckergradientensedimentation noch ca. ein Molekül Pactamycin pro drei 30 S Untereinheiten nachweisbar, maximal ein Molekül pro 30 S Untereinheit. Die gebundenen Moleküle tauschen dennoch leicht mit freien Molekülen Pactamycin der Umgebung aus.

1.3.3.2 Hemmeffekte am Prokaryonten-Ribosom

Die derzeit aktuellste Darstellung der Hemmeffekte unseres Antibiotikums auf zellfreie Proteinsynthese-Systeme aus Bakterien findet sich bei TAI, WALLACE und DAVIS (1973). Vor dieser Arbeit hatten COHEN, HERNER und GOLDBERG (1969) gefunden, daß in einem poly U-abhängigen System von E.Coli mit gereinigten Initiationsfaktoren und N-Acetyl-Phenylalanyl-tRNA Pactamycin spezifisch die Initiation zu hemmen schien. TAI et al. (1973) dagegen zeigten, daß sich in einem E.coli-System mit vitalem messenger, in dem Initiation und Elongation getrennt gemessen werden konnten, die Konzentrationsbereiche für die Hemmung dieser beiden Funktionen durch Pactamycin stark überschneiden. Daher kann man Pactamycin in bakteriellen Systemen nicht so gut als selektiven Hemmstoff der Initiation benutzen, wie dies dort etwa mit Kasugamycin oder mit Pactamycin in Eukaryonten-Systemen möglich ist. Zum Schluß sei bemerkt, daß die Hemmung der Proteinsynthese durch Pactamycin in zellfreien Systemen von E.Coli erst bei ziemlich hohen Hemmstoffkonzentrationen erfolgt (10^{-4}M) (KAEMPFER und MESELSON, 1969).

1.3.3.3 Hemmeffekte am Eukaryonten-Ribosom

Auch hier bietet die Einleitung der jüngsten in unserer Literatur-zusammenstellung berücksichtigten Arbeit das klarste Bild. (KAPPEN, SUZUKI und GOLDBERG, 1973). In sehr viel eindeutigerer Weise als bei bakteriellen Systemen kann man hier feststellen, daß niedrige Hemmstoffkonzentrationen (10^{-7} - 10^{-6} M) sowohl in intakten Zellen als auch in ribosomenhaltigen zellfreien Extrakten selektiv die Initiation der Polypeptidsynthese hemmen. (MCDONALD und GOLDBERG, 1970. STEWART-BLAIR et al., 1971. LODISH et al., 1971). Bei höheren Konzentrationen (10^{-5} M) werden sowohl Initiation als auch Elongation blockiert. Das am besten studierte System ist hier das Kaninchen-Retikulozyten-System. Bei niedrigen Hemmstoffkonzentrationen wird dort die Bildung neuer Peptidketten blockiert, bereits begonnene Globin-Ketten werden jedoch an den Polysomen zuende synthetisiert. Die Polysomen zerfallen ordnungsgemäß in einzelne Ribosomen, aber die Bildung neuer Polysomenstrukturen wird gehemmt. Die Berichte über die Dissoziation von Polysomen unter dem Einfluß von Pactamycin werden im Zusammenhang mit eigenen Untersuchungen in dieser Arbeit zusammengefaßt dargestellt.

Während einige Arbeiten den Schluß nahelegen, daß bereits gebildete Initiationskomplexe durch Pactamycin inaktiviert werden, zeigt die Arbeit von KAPPEN et al. (1973) detaillierter, daß bei niedrigen Mg^{++} -Konzentrationen (2 mM) bereits inaktive "kleine" Initiationskomplexe in Gegenwart von Pactamycin gebildet werden (bestehend aus 40 S Untereinheit, mRNA und Met-tRNA_P). Diese "kleinen" Initiationskomplexe können nicht mehr mit der großen Ribosomenuntereinheit zu funktionsfähigen "großen" Initiationskomplexen assoziieren, und daher erklärt sich der Hemmeffekt. In Gegenwart von Pactamycin akkumuliert nachweislich der kleine Initiationskomplex. Bei Erhöhung der Magnesiumkonzentration kann jedoch der Hemmeffekt überspielt und wieder große Initiationskomplexe gebildet werden. Man muß daher mit diesen Autoren abschließend zugeben, daß derzeit der präzise Mechanismus, über den das Antibiotikum mit der

Initiation bei Eukaryonten interferiert noch nicht bis ins Detail bekannt ist.

1.4 Nebenwirkungen von Pactamycin

1.4.1 Synthese von DNA und RNA

Bei Bakterien ist bekannt, daß niedrige Konzentrationen einiger Inhibitoren der Proteinsynthese (wie etwa Pactamycin, Tetracycline, Chloramphenicol) keine hemmende Wirkung sondern im Gegenteil manchmal sogar eine stimulierende Wirkung auf die RNA-Synthese haben. (KERSTEN und LINKEMANN, 1969). Das heißt, während die Proteinsynthese partiell gehemmt wird laufen RNA- und DNA-Synthese weiter. So erlauben etwa bei *B. subtilis* Pactamycinkonzentrationen von $5 \times 10^{-6}M$ bis $1 \times 10^{-5}M$ noch eine fortdauernde RNA- und DNA-Synthese. Bei einer niedrigen PA-Konzentration ($1 \times 10^{-6}M$) steigt die RNA-Produktion auf das zweifache an, während die Proteinsynthese auf den halben Wert herabgedrückt wird. (KERSTEN, KERSTEN und CHANDRA, 1967). Auch unter Einwirkung von Chloramphenicol und Puromycin wird weiter RNA synthetisiert. (DAGLEY et al., 1962., SELLS, 1964., NOMURA, 1965.,) Bei höheren Organismen sind ähnliche Effekte für Cycloheximid und Puromycin bekannt. (WARNER et al., 1966., HOLLAND, 1963., MANDAL, 1969.,). Aus diesen Experimenten ist zu entnehmen, daß die Synthese von Ribosomenvorläufer-Partikeln ausgeführt wird, selbst wenn die Proteinsynthese gehemmt ist, daß aber die Umwandlung der neusynthetisierten Vorläufer in reife Ribosomen nur erfolgen kann, wenn die Proteinsynthese ungestört verläuft. Ein Einfluß von Pactamycin auf die DNA- und RNA-Synthese bei höheren Organismen ist bisher nur von BHUYAN (1967) beschrieben worden. In KB-Zellkulturen wurden gleichzeitig der Einbau von radioaktiv markierten Vorläufern der Nukleinsäuren in neu synthetisierte Nukleinsäuren und der Einbau von verschiedenen radioaktiven Aminosäuren in Proteine gemessen. Solche Messungen erfolgten mit oder ohne Zugabe von Pactamycin ins Kulturmedium. Die DNA-Synthese wird in geringerem Ausmaß und später als die Proteinsynthese gehemmt. Die RNA-Synthese wird

kaum beeinträchtigt. Diese Resultate können als Hinweis darauf gewertet werden, daß es auch bei Eukaryonten, wie bei den Prokaryonten bereits schlüssig gezeigt, zu einer Entkoppelung von Nukleinsäure- und Proteinsynthese kommen kann, wenn die Proteinsynthese gehemmt wird.

1.4.2 Methylierung von rRNA und tRNA

Bei Zugabe von niedrigen Pactamycinkonzentrationen in das Medium einer wachsenden Bakterienkultur (etwa so, daß die Proteinsynthese um 50% gehemmt wird) verläuft die RNA-Synthese weiter. Die während dieser Periode produzierten stabilen Ribonukleinsäuren (tRNA und rRNA) werden nachträglich methyliert (Gruppe KERSTEN, 1967). Die Wirkung von Pactamycin auf eine eventuelle postsynthetische Methylierung der Ribonukleinsäuren bei höheren Organismen ist bisher noch nicht untersucht worden.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß von in das lebende Tier injizierten Pactamycingaben auf die Struktur und Funktion einiger Komponenten des Proteinsyntheseapparates zu untersuchen. Dabei standen im Vordergrund des Interesses: Akzeptor-Funktion von tRNAs, Ribosomen-Funktion und Methylierbarkeit der tRNAs.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war schließlich auch die sorgfältige Diskussion unserer Resultate im Lichte einer zusammenfassenden Darstellung der sachbezogenen Literatur.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

- a) Bakterien: *Bacillus subtilis* W 23 ("madison") und
E.coli MRE 600 von Boehringer, Tutzing

Die Keime werden in der Kulturkollektion der Arbeitsgruppe W. und H. Kersten gehalten und in regelmäßigen Abständen (≤ 4 Wochen) auf Schrägagarröhrchen überimpft und bei 4°C gespeichert. Der Teil der Schrägagarröhrchen, die zum baldigen Gebrauch bestimmt sind, wird bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

- b) Ratten: Wistar White Rats
Geschlecht: ♂ Alter: 6 Wochen
Gewicht : 130 - 145 g, bezogen von der
Frauenklinik der Universität Erlangen und der Fa. Jauntz,
Kisslegg im Allgäu.

2.1.2 Technisches Material

- a) Homogenisator: Homogenisator nach Potter mit Zylinder aus kalibriertem Solidex-Glas und Teflon Kolben. 30 ml Fassungsvermögen. Fa. B. Braun, Melsungen. Motor und Thyristor-Regler Fa. Janke u. Kunkel, Staufen im Breisgau. Für kleinere Volumina: Glashomogenisatoren nach Dounce von 5 und 10 ml Fassungsvermögen. Fa. Braun, Melsungen.
- b) Dialyseschläuche: Cellulosematerial "Visking", Union Carbide Corp. Size: 8 x 100 FT. Lieferant: SERVA, Heidelberg. Porengröße 15 - 20 Å, Dicke ~ 0.025 mm. Vorbehandelt nach RICHARDSON, 1966, durch extensives Wässern, Kochen in 5% Natriumcarbonat und nach Zwischenwässerung in 1 mM EDTA-Lösung. Aufbewahrt in 0.01 mM EDTA in verschlossenen Gefäßen bei 4°C.

- c) Aufbewahrung des biologischen Materials: Ribosomen, Polysomen und Enzymextrakte wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, intakte Organe in der großen Köttermann Tiefkühltruhe bei -70°C , tRNA bei -20°C in Haushaltstiefkühltruhen. Für den flüssigen Stickstoff werden Spezial-N₂-Behälter verwendet, (keine O₂-Dewars!): 20 l Nitrogen-Refrigerator der Fa. Union Carbide und 50 l Dewar von British Oxygen Company, Cryoproducts.
- d) Injektionsmaterial: 1 ml Ein-Weg Tuberkulinspritzen "Primo". Ein-Weg Kanülen No. 12, Record fitting. Steril.
- e) Material für in vitro Testansätze: Glas-Konstruktionspipetten "Assistent"., Papier-Filterblättchen "Selecta" No. 598 g, $\varnothing$ 2.3 cm und Faltenfilter "Selecta" No. 595 1/2, $\varnothing$ 32 cm, beides Fa. Schleicher und Schüll. Szintillatorgläschen, Beta-Szintillationsspektrometer Packard TriCarb

2.1.3 Chemikalien

- a) Gängige Laborreagentien wie Saccharose, Äthanol, Natrium-Deoxycholat, Kresol, Phenol und Salze zur Herstellung von Puffern und Standard-Präparationslösungen wurden als p.A.-Materialien von Fa. E. Merck, Darmstadt bezogen.
- b) Spezielle Reagentien
- i) zum Organenaufschluß: Dithiothreitol ("Clealands Reagens") No. 233155, Calbiochem. A grade. Beta-Mercapto-Äthanol No. 28625, Serva, Heidelberg.
- ii) zum in vitro Peptidiesiersystem: ATP (Na-Salz., No. 150 28 NAAH), Phosphoenolpyruvat (PEP, Na-Salz., No. 152 96 SPAA), Phosphokinase (PK, Kristallsuspension, No. 157 47 EPAU) Phosphokreation (No. 154 02) und Kreatinphosphokinase (No. 153 34) von Boehringer GmbH, Mannheim bzw. Tutzing. GTP (als Li-Salz, No. 920 030) von Calbiochem, A-grade. Poly-Uridylsäure (Poly-U,

Code 11-308 50 UMP) von Fa. Miles. In einem Sedimentationsgeschwindigkeitslauf in der analytischen Ultrazentrifuge Beckman Model E wurde für die benutzten Chargen die Hochmolekularität des Materials vor Einsatz im Test überprüft. Das Material sedimentierte als eine nicht sehr stark polydisperse Bande mit einem Sedimentationskoeffizienten von ≥ 5 S-Einheiten und genügte damit unseren Anforderungen.

Radioaktiv markierte Aminosäuren von Radiochemical Center, Amersham. ^{14}C -Phenylalanin (No. CFB 70), spezifische Aktivität 492 mCi/mMol. Konzentration: 50 $\mu\text{Ci/ml}$. ^{14}C -Lysin, (No. CFB 69), spezif. Akt.: 31,2 mCi/mMol, Konzentration: 25 $\mu\text{Ci/ml}$. ^{14}C -Arginin, (No. CFB 63), spezif. Akt.: 32,4 mCi/mMol, Konzentration: 25 $\mu\text{Ci/ml}$. ^{14}C -Aminosäuregemisch: Proteinhydrolysat aus Grünalgenzellen mit nicht äquimolarer Zusammensetzung und auch nicht für alle Aminosäuren gleicher spezifischer Aktivität. Die prozentualen Anteile der Gesamtaktivität, die auf die einzelnen Aminosäuren entfallen, können aus dem Katalog des Herstellers entnommen werden und wurden von uns bei den Kalkülen mittlerer Aktivitäten und mittlerer Einbauraten verwendet. Spezifische Aktivität: 54 mCi/mMol C., Amersham No. CFB 25. Konzentration: 250 $\mu\text{Ci/4 ml}$.

- iii) zum Methylierungstest: Triäthanolamin, No. 8379 Fa. Merck, ^{14}C - S-Adenosyl-Methionin, (SAM, Amersham, No. CFA 360)., spezif. Akt.: 53 mCi/mMol, Konzentration: 50 $\mu\text{Ci/ml}$.
- iv) Antibiotikum: Pactamycin U-15,800 Lot 5292, THP 93-12 Upjohn Comp., Kalamazoo.

Ansatz der Pactamycin-Stammlösungen:

Die erwünschten Antibiotikakonzentrationen waren: 0.2, 0.4 und 0.7 mg Pactamycin/kg Tier-Körpergewicht. Die Antibiotika-Stammlösungen waren so anzusetzen, daß

die Gesamtmenge für eine Injektion in immer gleichem Volumen von 1 ml injiziert werden konnte. Bei einem mittleren Körpergewicht der 6 Wochen alten Ratten von ca. 150 g entspricht diese Anforderung folgenden benötigten Stammlösungen:

Gewollte Endkonz.	0.2	0.4	0.7	mg PA/kg Ratte
Ange-setzte St.-Lösung	0.034	0.068	0.10	mg PA/ml
Einwaage	2.72	5.44	8.0	mg PA/80 ml
Erreichte Endkonz.	0.226	0.45	0.66	mg PA/kg Ratte

Die gesamte Einwaage an Pactamycin wurde zunächst in 80 ml aqua bidest (titriert auf pH 2.2 mit HCl) gelöst und 15 - 20 min bei 4°C unter Lichtschutz gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 5 - 6 eingestellt (ungepufferte Lösung, exaktere pH-Einstellung schwierig). Auffüllen auf 80 ml mit aqua bidest und Einfrieren in Portionen von 12 ml bis zur Verwendung.

2.2 Methoden

2.2.1 Hemmversuch mit B.subt.

Um zu kontrollieren, ob die Antibiotika-Charge noch die vom Hersteller spezifizizierte Aktivität besaß, wurde ein Hemmversuch mit B.subt. durchgeführt. Die Sensibilität dieses Organismus für das Antibiotikum war im Arbeitskreis auf Grund früherer Untersuchungen besonders gut bekannt.

Von der bei 4°C gelagerten Stammkultur wurden einige Tage vor dem Versuch Sekundärkulturen in Schrägagarröhrchen angelegt, die bei Zimmertemperatur gehalten wurden. Von diesen Sekundärkulturen

wurden am Abend vor dem Versuch einige 100 ml Seitenarmkölbchen inokuliert. In den Kölben befanden sich 25 ml Minimalmedium nach NAKADA, 1965, modifiziert für die speziellen Bedürfnisse unseres B. subt.-Stammes. Die Kulturen wuchsen über Nacht (8 - 10 h bei 37°C) im New Brunswick Schüttelapparat (Schüttelgeschwindigkeit 7) an. Am anderen Morgen wurden aus zwei der Kölben mit annähernd gleicher Zelldichte zwei x 250 ml Minimalmedium in zwei 1-liter Erlenmeyer-Kolben im Verhältnis 1:10 beimpft. Diese Kulturen wurden ebenfalls in der Schüttelmaschine anwachsen gelassen bis auf eine optische Streudichte von ~ 0.6 OD 578, gemessen in mikrobiologischen Reagensgläsern im Streulichtaufsatz am Eppendorf-Photometer. Dieser Punkt der Wachstumskurve war nach drei bis vier Stunden erreicht. Danach wurden die Inhalte der beiden Kolben unter sterilen Kautelen vereinigt. Kurz zuvor war in vorgewärmte 100 ml Seitenarmkolben Antibiotikum in gleichen Volumina (0.5 ml) aus verschiedenen konzentrierten Stammlösungen einpipettiert worden. Die Stammlösungen waren so angesetzt, daß in den Kolben nach Zugabe von 20 ml der Bakteriensuspension (von 0.6 OD 578) Antibiotika-Endkonzentrationen von 0.4, 1, 2, 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ erreicht wurden. Für jede Konzentration und für die Kontrolle wurden zwei Kölben mitgeführt. Vom Zeitpunkt der Antibiotika-Zugabe an wurde das Wachstum in 1 h-Intervallen durch Trübungsmessung der Suspension verfolgt und registriert. Die Hemmkurve wurde aus den Mittelwerten graphisch gebildet.

2.2.2 Antibiotika-Behandlung der Ratten und Präparation von Rattenlebern

a) Lösungen

Puffer A (zur Präparation von Leber tRNA, Leber-Ribosomen und Polysomen, nach STAEHELIN, 1971)
0.2 M Saccharose, 0.1 M NH_4Cl , 5 mM Mg-Azetat, 20 mM Tris-HCl, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.5 bei 4°C.

b) Präparation

Nach Erhalt wurden die Tiere von uns noch drei Tage lang in Standardkäfigen weiter gepflegt. (Altromin Trockenfutter, Wasser). 10 Tiere wurden als Kontrollgruppe gehalten, und

zur Behandlung mit Antibiotikum für jede der drei Konzentrationen 10 weitere Tiere eingeteilt. Während dreier Tage wurde den Tieren zweimal am Tag in mindestens 6 h Abstand 1 ml Pactamycinlösung intraperitoneal injiziert. Nach Abschluß dieser Behandlungsperiode wurde den Tieren für mindestens 12 Stunden Futter und Wasser entzogen, um den Glykogengehalt der Leber zu erniedrigen. Die Tiere wurden dann ohne Narkose dekapitiert. Die Leber wurde schnell herauspräpariert, zweimal in kaltem Präparationspuffer (Puffer A) gewaschen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zwischen Dekapitation und Einfrieren sollten weniger als 2 min vergehen. Bei Aufbewahrung in der Tiefkühltruhe bei -70°C bleiben die Lebern ein bis zwei Monate in brauchbarem Zustand erhalten.

2.2.3 Präparation der Leber tRNA

a) Lösungen

95% Äthanol, 2% K-Azetat

2 M Tris-HCl pH 8

2M LiCl, 0.1 M K-Azetat pH 5.1

Phenol-Kresol-Lösung: Es können entweder 83 gr Phenolkristalle mit 10 ml Kresol und 7 ml aqua bidest gelöst und dann das Ganze destilliert werden, anschließend mit aqua bidest auf 100 ml aufgefüllt, oder einfacher nur das Phenol destilliert werden und dann wie oben mit Kresol und Wasser aufgefüllt.

Puffer A (siehe 2.2.2)

b) Präparationsschema

Die Präparation erfolgt im Wesentlichen nach der von AVITAL und ELSON, (1969) beschriebenen Methode. Wir gingen jedoch zur tRNA Präparation nicht wie diese Autoren von Gesamt-Zellextrakten aus sondern von S 100 - Fraktion. Der Grund hierzu war, daß wir nur über begrenzte Mengen an Ausgangsmaterial verfügten. Daher mußten wir aus denselben Zell-extrakten sowohl Ribosomen-Polysomen als auch Enzyme

(S100-Fraktion) als auch tRNA aus einem abgezweigten Teil der S100 Fraktion präparieren.

Die tiefgekühlte Leber wurde in 2.5-fachem Volumen an kaltem Puffer A aufgetaut, dann mit Scheren im selben Puffer grob zerkleinert. Anschließend Homogenisierung und Zellaufschluß in maximal 10 ml Portionen im Potter-Gefäß mit Teflon-Kolben bei maximaler Umdrehungszahl des Antriebs. (Das Glashomogenisatorgefäß wurde nur mit geringen und immer gleichen Mengen gefüllt um eine vollständigere und regelmäßigere Homogenisierung mit dreimaligem Einfahren des Kolbens erreichen zu können). Um eine Erwärmung des Pottergefäßes zu vermeiden wurde es während des Homogenisierens in einem Salz-Wasser-Eisbad gehalten. Das Homogenat wurde dann in der MSE 18 Kühlzentrifuge mit dem auf 4°C vorgekühlten 8 x 50 ml Rotor 30 min bei 15 000 upm abzentrifugiert (ca. 30 000 x g).

Der ersten folgt eine zweite differentielle Sedimentation für 15 min unter denselben Bedingungen. (Bei zwei kürzeren Sedimentationen verliert man weniger Ribosomen-Polysomen-Material als in einer längeren Zentrifugation bei gleich effizienter Säuberung des Extrakts von höhermolekularem Material). Der "postmitochondriale Überstand" wird hochtourig abzentrifugiert in der MSE 65 Zentrifuge, 8 x 25 Rotor, 2 h 105 000 x g, 4°C. Bei diesem Schritt werden Ribosomen und Polysomen von den leichteren Zellkomponenten wie Enzymen und tRNA getrennt, die im Überstand, der S 100 Fraktion, verbleiben. Die S 100 Proteine werden durch Phenol-Extraktion von der tRNA entfernt. Da im Anschluß eine Alkohol-Fällung erfolgt, ist dieser Schritt streng genommen nicht nötig. Wir behielten ihn dennoch bei, um bereits zu diesen frühen Zeitpunkt des langen Präparationsweges die RNAsen zu denaturieren, da sonst keine weiteren Maßnahmen zur Inaktivierung von RNase-Aktivitäten getroffen wurden. Zur Phenol-Extraktion wird zum S100-Überstand das gleiche Volumen Phenol-Kresol-Lösung zugesetzt und das Ganze

90 min bei 4°C gerührt. Das Gemisch wird dann 2 h bei 30 000 x g in der MSE 25 Zentrifuge, 6 x 250 ml Rotor, bei 4°C abzentrifugiert. Die wässrige Phase wird vorsichtig mit einer Plastik-Spritze abgehoben. Es folgt die erste Äthanol-Fällung mit dreifachem Volumen kalter Äthanol-Lösung. (Lösung bei -30°C aufbewahrt). Die tRNA Fällung zieht sich bei 20°C über mehrere Stunden hin. Wir beließen den Ansatz über Nacht in einer Tiefkühltruhe. Man erhält das Präzipitat durch Abzentrifugieren: 15 min in der Sorvallzentrifuge, 70 Skt. im Kühlraum.

Deacylierung: Zur Entfernung der gebundenen Aminosäuren von den beladenen tRNA Molekülen wird das Sediment mit 8 - 10 ml 2 M Tris-HCl pH 8.1 mit einem Glasstab im Dounce + Homogenisator suspendiert und 90 min bei 37°C (Brutraum) gerührt.

Anschließend wird die Suspension gekühlt und mit dreifachem Volumen an kaltem Äthanol die zweite Fällung der Ribonukleinsäuren eingeleitet, die über Nacht bei -20°C quantitativ abläuft. Abzentrifugieren in der Sorvall-Zentrifuge wie oben.

Lithium-Chlorid-Fällung: Um die ribosomale RNA von der löslichen RNA zu trennen, wird letztere jetzt selektiv mit LiCl gefällt. Äthanolreste werden aus dem Sediment durch Spülen mit Äther entfernt. Den Äther läßt man abdampfen. Dann wird das Sediment mit 5 ml LiCl-Lösung mit einem Glasstab im Dounce-Homogenisator vorsichtig suspendiert. Die Suspension wird durch eine Waschzentrifugation (Sorvall, 50 Skt, 10 min) von hochmolekularen Aggregaten befreit. Das hierbei anfallende Sediment wird noch einmal mit 5 ml LiCl-Lösung suspendiert, homogenisiert und zentrifugiert. Beide Überstände werden vereinigt und gegen das 1 000-fache Volumen aqua bidest im Kühlraum ca. 6 h lang dialysiert. Wasserwechsel nach ca. 3 h. Das Dialysat sollte jetzt nur noch tRNA enthalten, die mit dreifachem Volumen kalten Äthanol bei -20°C über Nacht gefällt wird. Das Präzipitat

wird in der Sorvall-Zentrifuge wie oben absedimentiert. Das Perillet wird gut vom Äthanol mit Äther getrocknet und in einem kleinen Volumen aqua bidest (1 - 2 ml) aufgenommen. Die zugesetzte Menge wird so gewählt, daß die tRNA Lösung eine Endkonzentration von ca. 150 - 200 OD₂₆₀/ml erreicht. Diese Konzentration kann entweder durch schrittweise Zugabe von Wasser und Kontrolle der Extinktion erreicht werden, oder durch Zugabe einer Wassermenge, die nach unserer mittleren Ausbeute an tRNA aus unbehandelter Leber abgeschätzt wird: 0.1 mg tRNA pro 1 g Leber = ca. 2.2 OD₂₆₀/1 g Leber. Die Richtwerte für die Endkonzentrationen ergeben sich aus folgenden beiden Anforderungen:

- a) Für die Stabilität von tRNA in Speicherlösungen scheint ein Konzentrationsoptimum dieser Größenordnung zu existieren.
- b) Zum Einsatz in den diversen enzymatischen Funktionstesten der tRNA steht für die tRNA ein Volumen von 10 - 20 µl zur Verfügung, in dem eine Menge von ca. 2 OD₂₆₀ enthalten sein muß.

Im allgemeinen verfahren wir so, daß bereits auf den vorhergegangenen Stufen der Präparation und besonders vor der letzten Alkoholfällung die optische Dichte des Präparates registriert wurde. Dies stellte eine Kontrolle des Präparationsganges und eine Sicherung gegen unbemerkte Verluste dar und erleichterte das Einstellen der Endkonzentration. tRNA löst sich in den angegebenen Konzentrationen sehr gut in Wasser, und man erhält eine klare Lösung, die in 0.5 ml Portionen geteilt und bei -20°C aufbewahrt wird. Unter diesen Bedingungen lassen sich die Präparate bis zu einem Jahr lang ohne festgestellte Veränderungen in ihren biologischen Aktivitäten aufbewahren.

c) Analytische Charakterisierung des Präparats:

- i) An allen tRNA Präparationen wurde ein Diphenylamin-Test durchgeführt nach der Standardprozedur, wie sie von SHATKIN, (1969) beschrieben ist. Dazu wurde eine Eichkurve mit Kalbs-Thymus DNA (Worthington, Charge No. 623)

aufgenommen. Mit diesem Test sollte untersucht werden, ob die tRNA-Präparationen noch Spuren verunreinigender DNA enthielten, da in unserer Arbeitsgruppe bei anderen tRNA-Präparationsmethoden solche Verunreinigungen erhalten wurden (H. KERSTEN, persönl. Mitteilung). Da die Reaktion in allen Fällen negativ ausfiel, kann geschlossen werden, daß unsere Stammlösungen weniger als $1/\mu\text{g}$ DNA pro ml (unter Nachweisgrenze des Tests) enthalten. Bei mittleren Konzentrationen der untersuchten Lösungen an tRNA von $200 \text{ OD}_{260}/\text{ml} \hat{=} 8\,800 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Relation nach MAHLER-CORDES: $44 \mu\text{g tRNA} = 1 \text{ OD}_{260}$) bedeutet dies ein Verhältnis von tRNA gegen eventuell unentdeckte Spuren von DNA von besser als $8\,800 : 1$. Die beschriebene Präparationsmethode liefert damit für unsere Zwecke hinreichend DNA-freie tRNA.

ii) Weitere Charakterisierung der tRNA:

Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelectrophorese
Lösungen:

Sammelpuffer: $0.0503 \text{ M Tris-HCl pH } 7.8 + 1 \text{ ml } 10\%$
Riboflavin/100 ml Puffer.

5% Sammelgel: $2.375 \text{ g Acrylamid} + 125 \text{ mg Bisacrylamid}$
zu 50 ml Sammelpuffer.

Trennpuffer: $0.936 \text{ M Tris-HCl pH } 8.9 + 0.23 \text{ ml}$
TEMED/100ml Puffer.

40% Acrylamid-Bisacrylamid Lösung zur Herstellung
des 10% Trenngels: $10 \text{ g Acrylam.} + 250 \text{ mg Bisacryl.}$
zu 25 ml Aqua bidest.

Peroxodisulfatlösung: $70 \text{ mg}/50 \text{ ml Aqua bidest.}$

10% Trenngel: 2 Teile 40% Acryl.-Bisacryl. Lösung
+ 2 Teile Trennpuffer
+ 4 Teile Peroxodisulfatlösung.

Kammerpuffer, pH 7.0: Diäthylbarbitursäure 0.03 M ,
Tris-HCl 0.0033 M .

1% Bromphenolrotlösung (ein paar Tropfen in jeder tRNA-Lösung) zum färben der tRNA-Proben

30% Glucoselösung zum beschweren der tRNA-Probe.

tRNA-Lösung: 5 OD_{260nm}/ml Aqua bidest.

Elektrophorese:

Sechs Glasröhrchen (Länge 15 cm, Ø 0.5 cm) werden mit 4 cm Sammelgel und 5.5 cm Trenngel gefüllt (von oben bis unten).

Zwei verschiedene tRNA-Präparate wurden analysiert: eins von Kontrolltieren, eins von mit 0.7 mg Pactamycin/Kg behandelten Tieren. Drei Konzentrationen von jeder tRNA-Lösung (0.5 OD₂₆₀, 0.4 OD₂₆₀, 0.375 OD₂₆₀) wurden auf jeweils drei Elektrophoreseröhrchen aufgetragen. Die Gele liefen 4 Stunden von 0.25 mA (40 V) bis 2 mA (230 V) pro Röhrchen. Die Trenngele wurden an der Pufferfront geschnitten und fixiert (10% Essigsäure, 1% Lanthanacetat). Die Färbung findet in einer 0.2%igen Methylenblau, 0.4 M Essigsäure, 0.4 M Na-Azetat Lösung (pH 4.7) statt, dann erfolgt die Entwässerung.

Phasenumkehr-Säulenchromatographie nach KELMERS (PEARSON et al, 1972)

Die gesamte deacylierte tRNA-Präparation wurde mit radioaktivmarkiertem Phenylalanin zuerst beladen und dann wurden die phenylalaninspezifischen tRNA von den anderen unbeladenen tRNA's getrennt.

Lösungen:

Puffer II: 0.45 M NaCl, 0.01 M Mg-Azetat, 0.01 M Na-Azetat pH 4.5.

Puffer III: 1 M NaCl, 0.01 M Mg-Azetat, 0.01 M Na-Azetat pH 4.5.

Chromatographie:

22.5 OD₂₆₀ Kontroll tRNA wurden mit 25 nMol ¹⁴C-Phe. (spezifische Aktivität: 500 mCi/mMol) und 22.5 OD₂₆₀ "0.7" tRNA mit 25 nMol ³H-Phe. (spezifische Aktivität: 5 Ci/mMol) beladen. Zur Rückgewinnung der beladenen tRNA's wurden beide Reaktionsgemische mit dem gleichen Volumen 0.01 M Mg-Azetat, 0.001 M EDTA, 0.25 M NaCl pH 4.8 (Puffer I) versetzt und jeweils auf einer kleinen DEAE-Cellulosesäule (1x3 cm) aufgetragen (nach YANG und NOVELLI, 1968).

Die Säulen waren mit dem Puffer I äquibriert worden, und mit dem selben Puffer gewaschen. Die Elution geschieht bei Zimmertemperatur mit 3 ml 1 M NaCl, 0.01 M Mg-Az., 0,001 M EDTA Lösung, pH 4.8. Die Eluate werden mit einer 0.01 M Mg-Az-Lösung auf die für die weitere Chromatographie gewünschte Kochsalzkonzentration (0.45 M) verdünnt.

Die Säule (2 cm x 70 cm) wurde mit dem Puffer II bei Zimmertemperatur äquibriert. Der Elutionsgradient ging von 0.45 M NaCl zu 1 M NaCl. Das Volumen des Salzgradientes beträgt 31. Die Elutionsgeschwindigkeit war auf 5 ml/3 mm geregelt. Absorbtion bei 260 nm und cpm (counts pro Minute) wurden für jede vierte Fraktion gemessen.

2.2.4 Präparation der Ribosomen-Polysomen-Fraktion

a) Lösungen

Puffer A wie zur tRNA-Präparation

10%ige Natrium-Desoxycholat-Lösung in 5 mM Tris-HCl, pH 8.2

1 M Saccharose-Lösung: in Puffer A ohne Saccharose wird die benötigte Gesamtmenge Saccharose gelöst.

b) Präparationsgang

Der normale Präparationsgang nach MUNRO, (1964) ist etwas modifiziert worden. Der Grund hierzu war wie schon erwähnt die Notwendigkeit, aus demselben Zellextrakt Ribosomen, S 100 und tRNA präparieren zu müssen wegen der begrenzten zur Verfügung stehenden Organ-Mengen aus behandelten Ratten. Der normale Präparationsgang (nach MUNRO) dauert ca. einen halben Tag, der modifizierte Gang 1 1/2 Tage, da hier die Membranextraktion erst nach der ersten hochtourigen Sedimentation erfolgen kann und daher eine zweite hochtourige Zentrifugation mit anschließender Suspension erforderlich wird. Gleichzeitig zur Polysomen-Präparation können jedoch die ersten Schritte der tRNA-Präparation durchgeführt werden. Die gesamte tRNA-Präparation zieht sich über 3 1/2 - 4 Tage hin.

Als Ausgangsmaterial für eine Präparation wurden jeweils fünf Rattenlebern verwendet. So blieb die Hälfte der Organe aus behandelten Tieren noch für eine zweite Präparation in Reserve für den Fall, daß die erste Präparation verunglückte. Auf parallelen Aufschluß von mit zwei verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen behandeltem Organmaterial wurde ebenfalls aus Sicherheitsgründen verzichtet. Bei einem Durchschnittsgewicht einer Rattenleber von 6 - 7 g bedeutet dies eine Ausgangsmenge von 30 - 40 g.

Bis zur S 100 - Zentrifugation in der MSE 65 Zentrifuge sind die Präparationsschritte für tRNA und Polysomen die selben. Das Sediment der ersten hochtourigen Zentrifugation, das "Microsomen-Pellet" wird dann mit Natrium-Desoxycholat behandelt, um die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums zu entfernen. Die Mikrosomen-Sedimente vom gesamten Ausgangsmaterial werden vereinigt und in insgesamt 10 - 20 ml Puffer A vorsichtig suspendiert. Die ziemlich hohe Ionenkonzentration dieses Puffers stabilisiert die Polysomen und

fördert die Wirkung des Natrium Desoxycholats (NaDOC). 10%ige NaDOC-Lösung wird unter ständigem Rühren zugegeben solange bis im Gesamt-Endvolumen eine NaDOC-Konzentration von 1% erreicht ist. Dann wird 90 min bei 4°C gerührt, danach 15 min in der Sorvall Zentrifuge bei 70 Sct im Kühlraum absedimentiert. Der Überstand wird in Zentrifugenröhrchen für den 8 x 25 ml-Rotor der MSE 65 Zentrifuge auf ein 5 ml -"Kissen" von 1 M-Saccharose-Lösung langsam mit einer Pasteurpipette aufgetragen und zwei Stunden bei 60 000 upm ($\hat{=}$ 240 000 x g) bei 4°C abzentrifugiert. Die Überstände werden verworfen, die Sedimente einmal mit Präparationspuffer A gespült, vereinigt und in einem kleinen Volumen (2 - 3 ml) desselben Puffers vorsichtig mit dem Dounce-Homogenisator suspendiert. Das zugesetzte Puffer-volumen wird so gewählt, daß eine Endkonzentration von ca. 350 OD₂₆₀/ml erreicht wird. Diese Konzentration entspricht wieder den Erfordernissen für Stabilität bei der Lagerung und für geeignete Konzentration bei späterer Verwendung von aliquots in enzymatischen Testansätzen. Die Suspension enthält jetzt ein Gemisch von Polysomen und freien Ribosomen. Portionen von 0.5 ml werden in 1 ml Eppendorf Reaktionsgefäße abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei dieser Temperatur können die Präparate monatelang ohne große Aktivitätsverluste aufbewahrt werden. Die Ausbeute beträgt zu diesem Zeitpunkt ca. (20 ± 10) OD₂₆₀/1 g Leber. Wir können die mittleren Ausbeuten aus unserer Versuchsserie nicht genauer angeben, da wir bei den ersten Präparationen die erhaltenen Ausbeuten nicht registriert haben. Es kam uns damals mehr auf die Qualität (biol. Aktivität) der Ribosomen an. Das angegebene Mittel erstreckt sich über fünf Präparationen mit stärkerem Gewichtungsfaktor auf den letzten dreien.

2.2.5 Sedimentationslauf in einem stabilisierten Zuckergradienten

Die Gradienten wurden in einer Mischkammer nach NOLL (1969) hergestellt. Es wurde besonders darauf geachtet lange Zentrifugen-

röhrchen ($9/16'' \times 3\frac{1}{2}''$) zu verwenden, um eine möglichst große Trennstrecke zu erhalten. Solche Röhren konnten nur in einem Beckman Ausschwingrotor (SW 41 TI) benutzt werden. Die Röhrchen enthalten in einem 12 ml Volumen einen 15 bis 30% Saccharosegradienten. Die Reproduzierbarkeit der Gradienten wurde mehrfach durch Refraktometrie geprüft. Auf die 12 ml 15-30% Zuckerlösung werden von jeder Ribosomen-Polysomenpräparationen 0,2 ml aufgelegt. Die Konzentration jeder Präparation beträgt ca. $10 \text{ OD}_{260\text{nm}}$ Ribosomen-Polysomen in 0.2 ml Puffer A.

Nach 30-45 Minuten Zentrifugation bei 40 000 Upm ($0-4^{\circ}\text{C}$) wird der Inhalt jedes Röhrchens sorgfältig von schwerem zu leichtem Zucker mit einer langen dünnen Glaskapillare (also von unten bis oben) ausgepumpt. Die Kapillare ist mit einer Quarz-Durchflußküvette ($d = 1 \text{ cm}$), die in einem Zeiss-PMQ II steht, verbunden. Eine LKB-Perpex-Pumpe (Getriebe 3×30) pumpt die 12 ml in 38 min. Eine LKB-Ultrorac-Fraktionssammler teilt das 12 ml Volumen in 0,32 ml Fraktionen/Minute. Ein angeschlossener Schreiber registriert die Absorption (Vorlauf: 1 cm/min/Fraktion).

2.2.6 Präparation der S 100-Roh-Enzymfraktion

Ein Teil des S 100 Überstandes, der beim oben beschriebenen Präparationsgang anfällt, wird sofort in 1 ml Chargen in 1 ml Plastik-Reaktionsgefäßen (Eppendorf) eingefroren (flüssiger Stickstoff) und als Rohenzymextrakt im Peptidisiersystem oder zu vergleichenden Versuchen mit pH 5 Fraktion im Methylierungstest verwendet. Aus dem anderen Teil wird tRNA oder pH 5-Enzymfraktion weiterpräpariert.

2.2.7 Präparation der pH 5-Enzymfraktion

Aus den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (KERR und BOREK, 1971, KERSTEN, 1972) resultiert, daß im S 100 Überstand aus Bakterien und Zellen höherer Organismen unter bestimmten Bedingungen Hemmstoffe einiger methylierender Enzyme enthalten sind.

Diese können durch Präparation der sog. pH 5 Fraktion weitgehend eliminiert werden. Die pH 5 Fraktion wird durch einen weiteren Reinigungsschritt aus S 100 Roh-Enzymextrakt gewonnen. Einige Arbeitsgruppen (B.EMMERICH und B.GOERTZ, 1971, ZOMZELY-NEURATH, 1972) bedienen sich auch der pH 5 Fraktion für zellfreie Peptidsynthese aus Gehirnextrakten.

Zwei verschiedene Methoden zur Präparation der pH 5-Fraktion, die sich nicht sehr voneinander unterscheiden, wurden erprobt:

a) Methode nach FALVEY und STAEHELIN,

b) Methode nach KERR und BOREK

a) Methode nach FALVEY und STAEHELIN:

i) Lösungen:

Präparationspuffer B

0.3 M Saccharose, 5 mM Mg-Azetat, 10 mM Tris-HCl,

1 mM Dithiothreitol, pH 7.5 bei 4°C

Puffer A ohne Saccharose

1 mM Dithiothreitol

ii) Präparationsvorgang:

S 100 Überstand wird mit zweifachem Volumen 1 mM Dithiothreitol versetzt. Tropfenweise und unter ständigem Rühren bringt man jetzt mit einer Pasteurpipette und 1 M Essigsäure die Präparation auf pH 5.2. Zentrifugieren 10 min bei 10 000 Upm im 8 x 50 Rotor der MSE 18, entsprechend ca. 11 000 x g. Das Sediment wird in einem Volumen an Puffer A (ohne Saccharose) resuspendiert, welches gleich dem sechsten Teil des ursprünglich zu dem Sediment gehörenden Volumens an S 100 ist. Der pH-Wert wird noch einmal gemessen und vorsichtig mit 1 N KOH auf 7.5 bis 7.6 gebracht. Abschließend wird die Fraktion einer Waschzentrifugation (10 min, 10 000 Upm, 8 x 50 Rotor, MSE 18 Zentrifuge ca. 11 000 x g, 4°C) unterworfen. Der Überstand wird in 0.5 ml Portionen eingefroren und in flüssigem N₂ aufbewahrt, das Sediment wird verworfen.

b) Methode nach KERR und BOREK

i) Lösungen:

10 mM EDTA, pH 5

10 mM Tris, 1 mM Mercaptoäthanol, pH 8

ii) Präparationsgang:

S 100 Überstand wird mit 1N Essigsäure tropfenweise auf pH 5 gebracht, dann 10 min bei 6 000 x g abzentrifugiert. Das Sediment wird einmal mit 10 mM EDTA-pH 5 gewaschen, suspendiert, absedimentiert, und dann in 10 mM Tris- 1mM Mercaptoäthanol pH 8 suspendiert. Abzentrifugieren. Der Überstand wird als Enzymquelle benutzt, in 0.5 ml Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufbewahrt.

2.2.8 Testsysteme

2.2.8.1 Akzeptoraktivitäts-Test der t-RNA

Die biologisch-chemische Fähigkeit der tRNA bei enzymatischer Beladung Aminosäuren zu binden (akzeptieren) wird in vitro mit dem im Folgenden beschriebenen System getestet.

a) Lösungen:

^{14}C -Phenylalanin, spezif. Aktivität 50 mCi/mMol. In den Ansatz werden 10 μl von der Lösung gegeben, enthaltend 5 nMol (^{14}C und ^{12}C)-Phenylalanin. Bei einem Ansatz-Volumen von 250 μl ist damit die Phe-Konzentration im Ansatz insgesamt 0.02 mM.

^{14}C -Arginin von einer spezifischen Aktivität von 32,4 mCi/mMol. In den Ansatz werden 10 μl von der Lösung gegeben. Darin sind 7.8 mMol (^{14}C + ^{12}C -) Arginin enthalten. Die Arginin-Konzentration im Ansatz ist 0.031 mM.

^{14}C -Lysin, spezif. Aktivität von 31.2 mCi/mMol. In den Ansatz werden davon 10 μl gegeben mit 8 nMol (^{14}C + ^{12}C)-Lysin. Die Lysin-Konzentration im Ansatz ist 0.032 mM.

^{14}C -markiertes Aminosäure-Gemisch, Spezifische Aktivität 54 mCi/mAtom C. Nach den Angaben des Herstellerkatalogs über die relative Zusammensetzung des Gemisches ergibt sich eine Anzahl von 5.2 C-Atomen für eine "mittlere Aminosäure" dieses Gemisches und damit eine spezifische Aktivität von 280 mCi/mMol "mittlere Aminosäure". In den Ansatz werden 10 μl von dieser Lösung gegeben, entsprechend 2.2 nMol mittlerer Aminosäure. Die Konzentration an mittlerer Aminosäure im Ansatz ist also $8.8 \times 10^{-6}\text{M}$.

Leber tRNA-Lösung: die tRNA ist in der Stammlösung in einer Konzentration von ca. 150 - 200 $\text{OD}_{260}/\text{ml}$ in aqua bidest gelöst. Davon werden 10 - 20 μl in den Ansatz eingebracht. Das sind 1 - 3 $\text{OD}_{260}/250 \mu\text{l}$. Mit der Relation $44 \mu\text{g}/10 \text{OD}_{260}$ und einem mittleren Molikulargewicht der tRNA von 25 000 - 30 000 dal errechnen wir eine tRNA-Konzentration von ca. 0.014 mM im Ansatz.

Enzymextrakt (S 100): Der in der beschriebenen Weise gewonnene Enzymextrakt enthält im Mittel 15 mg Protein/ml, gemessen nach LOWRY. Davon werden 10 μl in den Ansatz eingesetzt, entsprechend 150 μg Protein.

Energiepuffer für das Lebersystem: 5 mM ATP, 0.15 mM GTP, 15 mM Kreatinin-Phosphat (CP), 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kreatinin - Kinase (CK), 0.5 M Tris, 20 mM Mg-Azetat, 130 mM K Cl, 16 mM Mercaptoäthanol.

Ionenmilieu im Akzeptor-Aktivitäts-Test

Tris HCl	100	mM
Mg-Azetat	4	mM
NH_4Cl	4	mM
K Cl	26	mM
Dithiothreitol	0.4	mM
Mercaptoäthanol	3.2	mM
Saccharose	40	mM

b) Ansatz und Inkubation

Ein Beispiel eines Testansatzes ist mit dem Pipettierschema No. 1 gegeben. Die Lösungen (Aminosäuren tRNA, S 100, Energiepuffer etc.) werden in der Reihenfolge und in den Volumina einpipettiert, die das Schema angibt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes beträgt 250 μ l. Die Ansätze werden in Pyrex-Gläschen doppelt pipettiert. Die Gläschen stehen während des Pipettierens in einem Eisbad. Nach Beendigung des Pipettiervorganges wird der Ansatz mit einem Whirlmix gründlich durchmischt. Die Ansätze werden dann für max. 90 min in einem Wasserbad bei 30°C inkubiert. Nach 0, 30, 60 und 90 min werden von jedem Ansatz je 50 μ l entnommen und auf Papierblättchen aufgetragen. Die Blättchen werden in eiskalte 10%ige TCA-Lösung (ca. 300 ml) geworfen. Dabei werden die tRNA-Moleküle auf dem Blättchen gefällt und die Reaktion gestoppt. Das Ausmaß der Fällung und das Anhaften der gefällten tRNA-Moleküle am Filter-Blättchen ist erfahrungsgemäß (MANS und NOVELLI, 1960) proportional zu der in der Reaktionslösung vorliegenden tRNA-Konzentration. Damit ist die notwendige Bedingung erfüllt, um aus den gefällten Radioaktivitäten Aussagen über die relativen Aminoacylierungsgrade und damit über die Akzeptoraktivitäten verschiedener tRNA-Chargen aufzustellen, selbst wenn die Fällung und Anhaftung am Papierblättchen nicht quantitativ ist.

Nach mindestens 2 - 3 h Verweilzeit in der 10%igen TCA-Lösung werden die Papierblättchen auf einem Faltenfilter (Material 2.1.2) getrocknet. Anschließend werden sie zweimal (mit Zwischentrocknung auf dem Faltenfilter) für 30 min in eiskalter 5%iger TCA-Lösung gewaschen, um niedermolekulare Radioaktivität (^{14}C -Aminosäuren) von dem Blättchen zu entfernen. Danach Trocknung für 15 min in Äthanol-Äther-Gemisch (1:1) bei Zimmertemperatur unter dem Abzug. Die Blättchen werden dann einzeln in Packard-Szintillations-Gläschen gegeben und darin (offen) im Wärmeschrank bei

50°C für ca. 30 - 40 min vom Äthanol-Äther getrocknet.
Anschließend wird auf jedes Gläschen 24 ml Toluol-Szintillator - Flüssigkeit gegeben. Zählung im Packard Szintillationszähler nach Vorkühlen der Proben (2 h bei 4°C).

Pipettierschema 1: Akzeptoraktivitätstest

Ansatz Nr.

Datum:

^3H ^{14}C :

S 100:

tRNA :

EP :

Fragestellung :

	Komplett		-tRNA		-S100	
	1	2	3	4	5	6
^{14}C Phe	10 μl	10	10	10	10	10
tRNA	20	20	X	X	20	20
H_2O	120	120	140	140	120	120
Puffer A	20	20	20	20	50	50
EP	50	50	50	50	50	50
S100	30	30	30	30	X	X

Endvolum 250 μl

Als Leerwert wird ein (Doppel-) Ansatz ohne tRNA mitgeführt, um

- die Beladung nativ deacylierter tRNA-Moleküle der S 100 fraktion und
- die Radioaktivität von unspezifisch am Plättchen haften gebliebenem Material zu erfassen.

Zusätzlich wird ein sogenannter Blind-Wert (BW) mitgeführt. Dies ist ein in denselben Waschflüssigkeiten wie die anderen gewaschenes leeres Blättchen. Es wird genauso wie die anderen getrocknet und im Szintillator mitgezählt. Der Blindwert erfaßt die durch die Waschflüssigkeit auf das Blättchen verschleppten Aktivitäten. Diese sind jedoch auch schon im Leerwert ohne tRNA enthalten. Der Blindwert dient lediglich dazu, um bei Bedarf die beiden Effekte differenzieren zu können, wenn man ihre relativen Beiträge erfahren will. Blindwert und Leerwert dürfen jedoch nicht addiert und dann von den gesamten Zählraten subtrahiert werden. Subtrahiert wird nur der Leerwert.

2.2.8.2 Testsystem der zellfreien Peptidsynthese

Prinzip: Im zellfreien Ansatz werden radioaktiv markierte Aminosäuren in säurefällbares Polypeptid eingebaut, das auf Vorlage einer künstlichen Matriz (poly-U) oder endogener messenger-RNA von den zugesetzten Enzymen an den eingesetzten Ribosomen synthetisiert wird. Im Ansatz herrscht ein kritisch einzuhaltendes Ionenmilieu. Die Reaktionslösung enthält ferner Aminosäuren, tRNA, ATP und ein Energie-regenerierendes Enzymsystem.

a) Lösungen:

^{14}C -Phenylalanin, ^{14}C -Aminosäuregemisch, Leber-tRNA-Lösung: wie unter 2.2.7.1 (Akzeptoraktivitäts-Test).

Energiepuffer für bakterielles System:

2.5 mM ATP., 0.075 mM GTP., 12.5 mM PEP, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PK, 250 mM Tris-HCl, 15 mM Mg-Azetat, 65 mM KCl, 8 mM Mercapto-
äthanol.

Energiepuffer für Lebersystem: wie unter 2.2.8.1

Dieser Puffer unterscheidet sich von dem oben genannten hauptsächlich durch das Energie-regenerierende System.

S 100 Fraktion für das bakterielle System:

In Nierenberg Präparationspuffer. Konzentration 12 - 16 mg Protein/ml, gemessen nach LOWRY. In den Ansatz werden davon 20 - 10 μ l einpipettiert, entsprechend 150 - 300 μ g Protein.

S 100 Fraktion für das Lebersystem: siehe unter 2.2.7.1.

Ribosomenfraktion für das bakterielle System:

Die Ribosomen-Stammlösungen in Nierenberg-Standard-Puffer (S II) enthalten im Mittel 350 OD₂₆₀/ml oder wurden nach dem an das Auftauen anschließenden Wasch-Zentrifugationsschritt auf diese Konzentration eingestellt. Dies entspricht ca. 20 mg Ribosomen/ml. (Die Relation für bakterielle Ribosomen lautet nach VOGT und MATTHAEI, 1968: 10 mg hochgereinigte Ribosomen $\hat{=}$ 170 OD₂₆₀). Davon werden in den Ansatz pipettiert 50 μ l $\hat{=}$ ca. 17 OD₂₆₀ $\hat{=}$ ca. 1 mg Ribosomen.

Ribosomen-Polysomen-Fraktion für das Leber-System:

Ribosomen gelöst in Puffer A in einer mittleren Konzentration von ebenfalls ca. 350 OD₂₆₀/ml. (siehe 2.2.4). Bei Einsatz von ebenfalls 50 μ l in den Ansatz sind dies ca. 1.2 mg Ribosomen aufgrund der für Rattenleber geltenden Relation: (10 mg Ribosomen $\hat{=}$ 130 OD₂₆₀).

tRNA für das Lebersystem: siehe 2.2.7.1

tRNA für das bakterielle System: E.Coli tRNA von Schwartz oder für das E.Coli MRE 600 System homologe tRNA aus dem gleichen Stamm von Boehringer wurde benutzt. In den ersten Versuchen wurden Stammlösungen von 25 mg tRNA/ml benützt und davon 10 μ l in den Ansatz eingesetzt. Diese Konzentrationen konnten bei späteren Versuchen ohne Einbaueinbußen um einen Faktor 2 - 3 verringert werden.

Poly-Uracilsäure: Poly-U wird gelöst in aqua bidest in einer Konzentration von 8 mg/ml.

Ionenmilieu: Das Ionenmilieu im Peptidisiertest für das bakterielle und für das tierische System ist in den Tabellen No. 1 und No. 2 angegeben.

Konzentrationen von Ionen und anderen Substanzen
im Peptidisiertest.

Tabelle 1: in bakteriellem System

Tris-HCl pH 7.8	100	mM
Mg-Azetat	16	mM
K Cl	50	mM
Mercaptoäthanol	6	mM
ATP	1	mM
GTP	0,03	mM
PEP	5	mM
PK	20	$\mu\text{g/ml}$

Tabelle 2: im Lebersystem

Tris-HCl pH 7.8	108	mM
Mg-Azetat	8	mM
K Cl	26	mM
NH ₄ Cl	40	mM
Mercaptoäthanol	3,2	mM
Dithiothreitol	4	mM
Saccharose	40	mM
ATP	1	mM
GTP	0,03	mM
CP	2	mM
CPK	50	$\mu\text{g/ml}$

b) Ansatz und Inkubation

Bei Verwendung eines künstlichen Messengers wird durch eine Vorinkubation endogene messenger-RNA verdaut, bevor die künstliche Matrize zugesetzt wird. Bei Verwendung endogener messenger RNA (Polysomen) entfällt dieser Schritt. Die einzelnen Komponenten werden in der Reihenfolge und in den Volumina in die Reaktionsgefäße einpipettiert, die im Schema No. 2 angegeben sind. S 100 und Ribosomen werden gleichzeitig einpipettiert. Ansatzvolumen wieder 250 μ l. Alle Ansätze doppelt. Die Reaktionsgefäße stehen während des Pipettierens in einem Eisbad. Nachdem bei zügigem Arbeiten (höchstens 20 Ansätze pro Person) alle Komponenten bis auf den künstlichen messenger einpipettiert sind, wird mit einem Whirlmix-Schüttler gründlich durchmischt und die Vorinkubation (10 min, 37°C im Wasserbad) gestartet. Ab Beginn der Vorinkubation läuft die Stoppuhr, und es muß ab jetzt in konstanten Zeitintervallen gearbeitet werden, um alle Ansätze synchron zu behandeln. Danach wird die eigentlich verfolgte Reaktion durch Zugabe des künstlichen messengers gestartet. Unmittelbar nach Zugabe wird bereits der 0 min-Wert (50 μ l) entnommen, der später dazu dient, auf die während der Vorinkubation eingebaute Menge radioaktiver Aminosäuren zu korrigieren. Weitere Proben von 50 μ l werden alle 30 min entnommen, also 40, 70 und 100 min nach Beginn der Praeinkubation. Nach 100min ist die Reaktion bereits sehr langsam oder sogar schon ganz zum Erliegen gekommen. Soll eine Kinetik des schnelleren Anfangsteils der Reaktion aufgenommen werden, so können selbstverständlich Proben auch zu den Zeitpunkten 10, 20, 30 und 40 min nach Beginn der Praeinkubation entnommen werden. Noch schnellere Folge der Meßpunkte ist für eine allein arbeitende Person nicht durchführbar, da die Entnahme der Proben aus den 20 Ansätzen ca. 10 min dauert. Die Technik des Tests ist sehr ähnlich derjenigen des Akzeptoraktivitätstests. Die Inkubation findet allerdings hier bei 37°C statt. Auch der Waschvorgang der Filterblättchen unterscheidet sich hier in einem wichtigen

Punkt: dem Hydrolyse-Schritt. Durch Inkubation der Filterblättchen (nach der 3 h-Fällung in eiskalter 10%iger TCA) für 15 min bei 90°C in 5%iger TCA-Lösung wird die letzte Esterbindung zwischen tRNA und beladender Aminosäure hydrolytisch gespalten. Damit wird die eventuell radioaktiv markierte Aminosäure von der tRNA freigesetzt. Die auf dem Blättchen verbleibende Radioaktivität ist der Ausdruck nur der während der Inkubation bei 37°C polymerisierten Peptide. Die folgenden Waschschrirte der Filterblättchen werden wie bei Akzeptoraktivitäts-Test durchgeführt.

Pipettierschema 2: zellfreie Peptidsynthese

Ansatz Nr. Datum:

^3H ^{14}C : Ribos:

Messenger : S 100:

tRNA :

EP :

Fragestellung :

	Komplett		-tRNA		-Ribos/ S100		-Poly U		9	10
	1	2	3	4	5	6	7	8		
^{14}C Phe	10 μl	10	10	10	10	10	10	10		
tRNA	20	20	X	X	20	20	20	20		
H ₂ O	60	60	80	80	60	60	70	70		
Puffer A	40	40	40	40	100	100	40	40		
EP	50	50	50	50	50	50	50	50		
Rib	30	30	30	30	X	X	30	30		
S 100	30	30	30	30	X	X	30	30		
Poly U	10	10	10	10	10	10	X	X		

Endvolum 250 μl

c) Leerwerte

Zur Ermittlung der echten Netto-Einbauraten während der Hauptinkubation werden neben dem 0-min-Wert (nach Ende der Vorinkubation) noch weitere Leerwerte benötigt.

a) ohne Ribosomen und S 100

b) ohne tRNA

c) ohne poly - U (s.o.) und

d) Blindwerte (siehe Akzeptoraktivitäts-Test) mitgeführt.

Leerwert a) dient dazu, die nicht-enzymatisch katalysierte Polymerisierung von Aminosäuren sowie den eventuellen Untergrund an Radioaktivitäts-Zerfällen im saure-gefallten Material zu erfassen.

Leerwert b) dient dazu, den Einbau durch noch an den Ribosomen hängende und in S 100 mitgebrachte tRNA festzustellen. Diese Leerwerte ermöglichen das Studium der Abhängigkeit des Einbaus speziell von der Menge der extern zugegebenen tRNA. Diese Kontrolle wird besonders wichtig, wenn spezifische tRNAs eingesetzt werden sollen. In diesem Falle können Ribosomen und S 100 durch weitere Reinigungsschritte (Dialyse, DEAE-Sephadex) von tRNA befreit werden.

Leerwert c) dient dazu, den Einbau durch endogenen Messenger (noch am Ribosomkomplex sitzend) zu messen. Auf diese Weise erkennt man, ob die Vorinkubationsdauer, um alle endogene messenger-RNA zu zerstören, ausreicht.

2.2.8.3 Testsystem der in vitro nachträglichen Methylierung der t-RNA

Prinzip: Durch spezifische Enzyme wird die $^{14}\text{C-CH}_3$ Gruppe von S-Adenosylmethionin (aktiviertes Methionin) auf t-RNA übertragen. Der Test wird nach HURWITZ et al (1964) durchgeführt.

a) Lösungen:

TMMg Puffer pH 8.0: 100 mM Triäthanolamin, 20 mM Mercapto-
äthanol, 10 mM MgCl_2 .

S-Adenosylmethionin in 10^{-3} N H_2SO_4 gelöst.

Konzentration: 1.5-3 mM

Spezifische Radioaktivität: 2,5 c/M, 5 C/M, 10 C/M

Ribonucleinsäure: 40-80 OD₂₆₀/ml 0.05 M Tris-Hcl pH 8.0

Enzyme: 1.5-10 mg/ml (in Präparationspuffer gelöst).

Alkoholgemisch zum Waschen der Plättchen:

2600 ml 95% Aethanol, 120 ml Eisessig, 1.6 ml 10% KOH.

b) Ansatz und Inkubation

Die Lösungen werden in der folgenden Reihenfolge pipettiert:
0.01 ml S-Adenosylmethionin 0.05 ml tRNA, 0.05 ml TMMg Puffer,
0.05 ml Enzymlösung. Endvolum des Testansatzes: 0.16 ml.
Das Pipettieren findet wie bei üblichen Testen im Eisbad
statt. Nach dem Pipettieren wird jeder Ansatz gemischt
und zwei Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert, von 37°C
auf 0°C im Eisbad abgekühlt.

Von jedem Ansatz werden 0.1 ml auf Whatman-Papierplättchen
(W.&R. Balston LTD, grade 3 mm, Size 2-4 mm) aufpipettiert.
Die Plättchen werden in 10% TCA (0-4°C) mindestens 30
Minuten gehalten, dann dreimal in 5% TCA (0-4°C) fünf Minuten
und zweimal im kalten Alkoholgemisch (0-4°C) und einmal in
Aether gewaschen. Zwischen jedem Waschvorgang werden die
Plättchen immer auf Faltenfilter abgetropft. In offenen
Packardszintillationsgläsern werden sie im Wärmeschrank
bei 50°C für ca. 30 - 40 min. getrocknet. Auf jedes Gläschen
kommen 12 ml Toluol-Szintillatorflüssigkeit.

Für eine Langzeitkinetik beträgt das Ansatzvolumen 0.32 ml.
Davon werden fünfmal 50 µl auf Papierplättchen aufpipettiert.

2.2.8.4 Auswertung der Ergebnisse

Berechnung des Bruttoeinbaus an Aminosäure aus dem gemessenen cpm/Filter:

a) Definition:

Der Bruttoeinbau an Phenylalanin z.B. ist die Zahl eingebauter nMol Phe ($^{14}\text{C} + ^{12}\text{C}$) /1 nMol 80S Rib./Zeiteinheit.

b) Einsatz an Substanz ($^{12}\text{C} + ^{14}\text{C}$ Aminosäure) in dem Ansatz

Man weiß, daß: 1 Ci $\hat{=}$ 3.7×10^{10} dpsec

1 Ci $\hat{=}$ 222×10^{10} dpm

1 uCi $\hat{=}$ 222×10^4 dpm

0.05 uCi = 550 000 dpm $\hat{=}$ 380 000 cpm bei

70%iger Ausbeute im Packard.

Die folgende Tabelle gibt die Korrelation cpm-nMol $^{12}\text{C} + ^{14}\text{C}$ Aminosäure pro Ansatz für verschiedene Aminosäuren bei ihrer entsprechenden spezifischen Aktivität.

	nMol $^{12}\text{C} + ^{14}\text{C}$ Aminos./Ansatz	bei spez. Aktiv. mCi/mMol	Radioakt. im Ansatz in uCi	cpm (Ausbeute 70%)
Phe	5	50	0.25	380 000
Lys	8	31.2	0.25	380 000
Arg.	7.8	32.4	0.25	380 000
AS	2.2	54 mCi/0.2	0.62	960 000
Mix		"nMol"		

c) Einsatz an Ribosomen in dem Ansatz

Es gilt die folgende Beziehung:

$13 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \hat{=}$ 1 mg $\hat{=}$ 1 nMol 80S Ribosom

d) Umrechnung von cpm auf nMol Aminosäure bei bestimmter spezifischer Aktivität:

	cpm	$\hat{=}$ nMol Aminosäure ($^{12}\text{C} + ^{14}\text{C}$)	spez. Aktivität
Phe	1000	0.013	50 mCi/mMol
Lys	1000	0.021	31.2 mCi/mMol
Arg	1000	0.020	32.4 mCi/mMol
AS	1000	0.0023	54 mCi/0.2 "mMol"
Mix			

e) Umrechnung von cpm/Filter (50 μ l) auf cpm/Ansatz (250 μ l)
dann auf cpm/nMol 80S Ribosom.

f) Umrechnung von cpm/nMol Ribosom auf pMol Aminos./nMol
Rib.

Für den Akzeptoraktivitätstest wurde das Ergebnis in pMol
 $^{12}\text{C} + ^{14}\text{C}$ - Aminosäure/1 OD₂₆₀ tRNA ausgedrückt. Die Umrechnung
von cpm/Filter in pMol Aminosäure/OD tRNA wurde nach den Werten
der zweiten Tabelle (S. oben) gemacht.

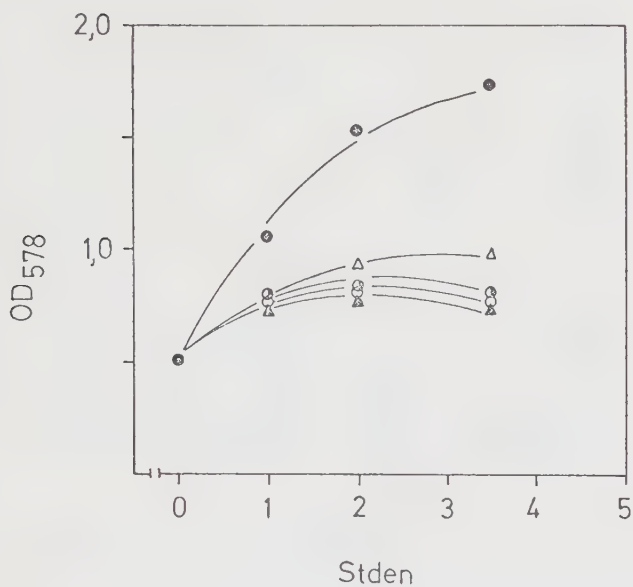
3. RESULTATE

3.1 Vorversuche

3.1.1 Überprüfung der Pactamycincharge

Pactamycin ist wie viele Antibiotika chemisch nicht sehr stabil. Wir wollten sicherstellen, daß die für die Hauptversuche benutzte Charge noch gute Hemmeigenschaften hatte. Ihre Hemmeffekte auf eine wachsende Bakterienkultur und auf die Synthese von Polyphenylalanin in einem zellfreien System (*Bacillus subtilis*) wurden getestet. Durch Vergleich mit den Erfahrungswerten aus der Literatur konnte dann die Qualität der Charge beurteilt werden. Als Ergebnis fanden wir eine Wachstums hemmung einer *B. subtilis* Kultur um 50% mit einer Pactamycin-Konzentration von 1×10^{-6} M. (Siehe Abb. 1). Zum Vergleich: BHUYAN gibt eine Verminderung der in vivo Proteinsynthese in einer Kultur von *B. subtilis* um 25% mit einer Pactamycinkonzentration von 1×10^{-7} M an (BHUYAN, 1967). KERSTEN und Mitarbeiter fanden für eine Pactamycin-Konzentration von 1×10^{-6} M eine Hemmung der in vivo Proteinsynthese um 50% und eine Hemmung des in vivo Einbaus von tritiiertem Leucin in Zellproteine um 80% für eine Hemmstoffkonzentration von 4×10^{-6} M (H.KERSTEN, W.KERSTEN, B.EMMERICH und P.CHANDRA, 1967). Damit zeigte unsere Antibiotikacharge Hemmeigenschaften auf wachsende Bakterienkulturen, die mit den Erfahrungswerten übereinstimmen. Auch die Wirkung dieser Charge auf die Polypeptidsynthese in zellfreien Extrakten von *B. subtilis* stimmte mit den Literaturergebnissen überein. Unser Testergebnis wird in Abb. 2 wiedergegeben.

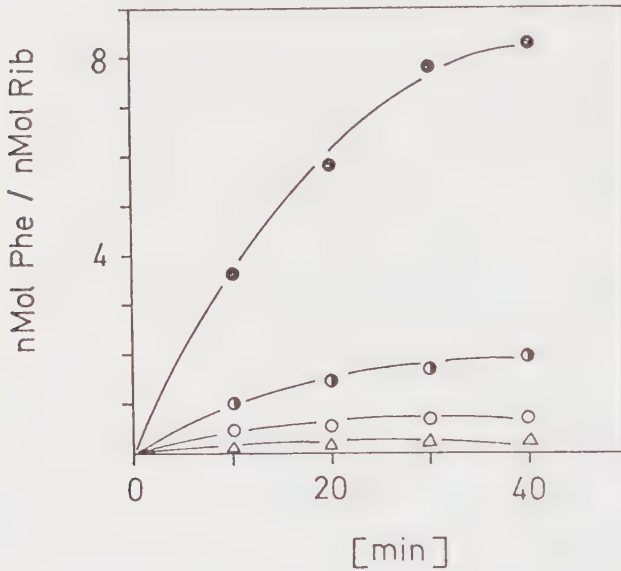
Abb. 1: Wirkung von Pactamycin auf das Wachstum von B.Subtilis



Wachstumsbedingungen: Siehe Material und Methode

- Kontrolle
- Δ—Δ 0,4 µg Pactamycin/ml
- 1 " "
- ◊—◊ 2 " "
- ▲—▲ 5 " "

Abb. 2: Wirkung von Pactamycin auf das zellfreie
Proteinsynthesystem von *B. Subtilis*



Der Inkubationsansatz (Endvolumen = 250 μ l) enthält:

25 μ Mol Tris-HCl pH 7.8; 4 μ Mol Mg-Azetat; 12.5 μ Mol K-Cl;
1.5 μ Mol β -Mercaptoethanol; 0.25 μ Mol ATP; 0.0075 μ Mol GTP;
1.25 μ Mol PEP; 5.0 μ g Pyruvate Kinase; 5 n Mol ¹⁴C-¹²C Phenylalanin;
4-5 OD₂₆₀ E.Coli tRNA (Schwarz); 150 μ g S-100 Überstand;
17 OD₂₆₀ Ribosom; 20 μ g Poly U - Präinkubation: 10 min bei 37°C,
Inkubation: 40 min bei 37°C

- Kontrolle
- + 2.10⁻⁶ M PA (1 μ g/ml)
- Leerwert ohne tRNA
- △—△ Leerwert ohne Poly U

Wir fanden mit einer Konzentration von 2×10^{-6} M ($1 \mu\text{g/ml}$) eine Hemmung der Polyphenylalaninsynthese von 70% gegenüber dem Kontrollansatz ohne Pactamycin. BHUYAN findet in einem zellfreien System aus *E. coli* eine Hemmung der Polyprolinsynthese von 50% bei einer Hemmdosis von 1.5×10^{-6} M. (BHUYAN, 1967). Die Gruppe KERSTEN findet eine signifikante Hemmung der zellfreien Peptidsynthese bei Pactamycinkonzentrationen niedriger als 1×10^{-5} M (KERSTEN, KERSTEN, EMMERICH und CHANDRA, 1967). Molare Konzentrationen sind dort nicht angegeben, da damals das Molekulargewicht nicht bekannt war. Nachträglich errechnet zum Vergleich).

Die Hemmwirkung der Charge mußte genau ausgetestet werden, weil besonders bei höheren Organismen kleine Konzentrationsveränderungen einen großen Einfluß auf die Wirkungsweise des Antibiotikums haben können (LODISH et al., 1971). Da die untersuchte Charge normale Hemmeigenschaften zeigte, konnte sie zu weiteren Versuchen eingesetzt werden.

3.1.2 Das zellfreie System der Peptidsynthese aus Rattenleber. Einfluß verschiedener Parameter auf das System.

Für die *in vitro* Messung der Aktivitäten verschiedener Zellkomponenten aus Pactamycin behandelten Tieren ist es wichtig in einem gut definierten Milieu und unter optimalen Bedingungen zu arbeiten. Bevor man auf die Pactamycin-Wirkung als Ursache von beobachteten Veränderungen biologischer Aktivitäten von Zellkomponenten schließen kann, muß man sicher sein, daß diese Veränderungen nicht vom Testsystem selber hervorgerufen werden können. Ein Testsystem wurde zu diesem Zweck mit normalen Leberzellkomponenten definiert.

3.1.2.1 Enzymkonzentration

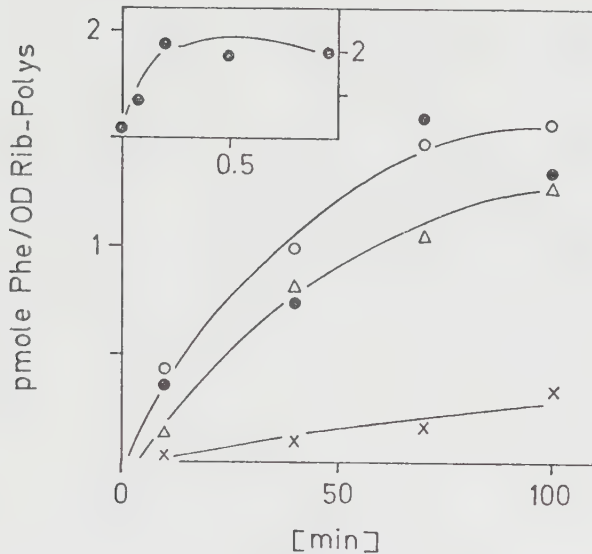
Abbildung 3 zeigt den Effekt einer Variation der Enzymkonzentration im Ansatz von 0.09 bis 0.94 mg Protein pro Testansatz. (Ansatzvolumen: 0.25 ml). Die Aminosäure - und Ribosomenkonzentration

blieb bei diesem Versuch konstant. Das Optimum liegt zwischen 0.2 und 0.9 mg Protein (Enzym) pro Ansatz. Der Proteingehalt der Enzymfraktion wurde nach LOWRY bestimmt (siehe dazu "Material und Methoden"). Der Gehalt der Ribosomen- und der tRNA-Präparationen an den hier gemessenen Überstandsenzymen ist vernachlässigbar, da der Leerwert ohne Zugabe von S 100 Extrakt (Überstandsenzyme) auf der Nulllinie liegt. (Nicht eingezeichnet in Abb. 3).

3.1.2.2 Ribosomenkonzentration

Unsere Ribosomenpräparationen waren Gemische von Ribosomen und Polysomen. Diese Fraktionierung wurde gewählt, um dieselbe Präparation auf der einen Seite im Einbautest mit endogener mRNA, auf der anderen Seite mit synthetischem Homopolymer als künstlichem Messenger zu testen. Abb. 4 zeigt die Abhängigkeit des Einbaus radioaktiver Aminosäuren in Polypeptide von der Konzentration derartiger Ribosomenpräparationen. Wir beobachteten eine Sättigung des Systems mit Ribosomen/Polysomen bei Zugaben von Mengen ab 8 OD₂₆₀-Einheiten. Bei noch höheren Mengen beobachten wir eine Wiederabnahme der Gesamt-Einbauaktivität. Der Leerwert ohne Ribosomenzusatz drückt den kontaminierenden Ribosomengehalt der tRNA und S 100-Fractionen aus.

Abb. 3: Einfluß der Enzymkonzentration auf das zellfreie Proteinsynthesystem der Rattenleber



Der Inkubationsansatz (Endvolumen = 250 μ l) enthält:

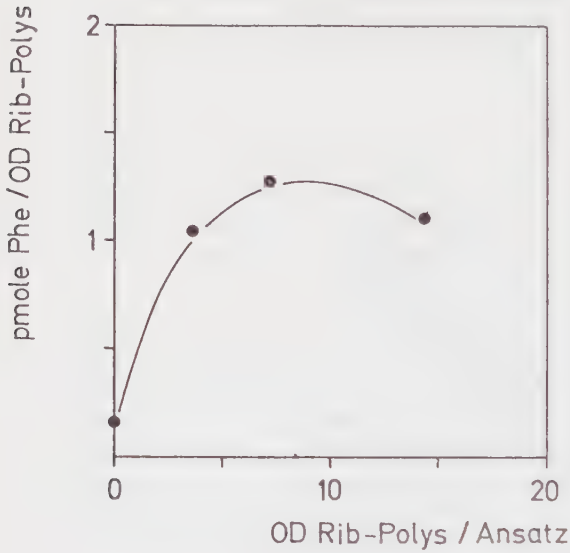
27 μ Mol Tris-HCl pH 7.8; 2 μ Mol Mg-Azetat; 6.5 μ Mol KCl;
 0.1 μ Mol Dithiothreitol; 0.8 μ Mol β -Mercaptoethanol; 0.25 μ Mol
 ATP; 0.0075 μ Mol GTP; 0.5 μ Mol CP; 12.5 μ g CPK; 5 nMol ^{14}C - ^{12}C
 Phenylalanin; 2 OD₂₆₀ Leber tRNA; 0.034 mg - 0.94 mg Enzym;
 7 OD₂₆₀ Leber Ribosomen; 80 μ g Poly U.

Präinkubation: 10 min bei 37°C, Inkubation: 90 min bei 37°C

X—X	0.094 mg Protein/Ansatz
O—O	0.188 mg " "
Δ—Δ	0.470 mg " "
●—●	0.940 mg " "

Einschub: Abhängigkeit der Inkorporation von der S 100 Konzentration
 (mg/Ansatz)

Abb. 4: Einfluß der Ribosomkonzentration auf das zellfreie Proteinsynthesesystem der Rattenleber



Testbedingungen: Siehe Legende der Abbildung 3.

Die Ribosom-Polysomkonzentration variiert zwischen 0 und 15 OD₂₆₀ pro Ansatz.

Enzymkonzentration: 0,94 mg/Ansatz.

Obwohl dieser Leerwert signifikant von Null verschieden ist, kann er für unsere Zwecke mit dem Untergrund gleichgesetzt werden, da die bei Ribosomenzugabe erzielten Einbauraten ihn um ein Vielfaches übersteigen. Der Leerwert ohne Zugabe von Ribosomen- und Enzymfraktion liegt auch in der gleichen Größenordnung. Der Leerwert ohne Zugabe von künstlicher messenger RNA (poly U) kann ebenfalls für unsere Zwecke in der Auswertung mit der Grundlinie gleichgesetzt werden. Es ist jedoch erforderlich, bei jeder Versuchsreihe diese Leerwerte mit zu messen um sich zu vergewissern, daß die Zehn-Minuten-Präinkubation der Ribosomen/Polysomen im Ansatz ohne exogene messenger RNA genügt, um den Einbau nach Vorlage der endogenen mRNA zu eliminieren. Dies war bei unseren Versuchen stets der Fall. Die beiden letzten Leerwerte wurden in allen Tests mit gemessen, aber nicht immer eingezeichnet. Typische Zahlenwerte in gezählten Impulsen pro Minute (counts pro min, abgekürzt:cpm) pro Testansatz sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3

Typische Zahlenwerte für die verschiedenen Leerwerte

Komplett	ohne Ribos.	ohne Ribos. und S 100	ohne poly U
1135 100 %	174 15 %	160 14 %	262 23 %

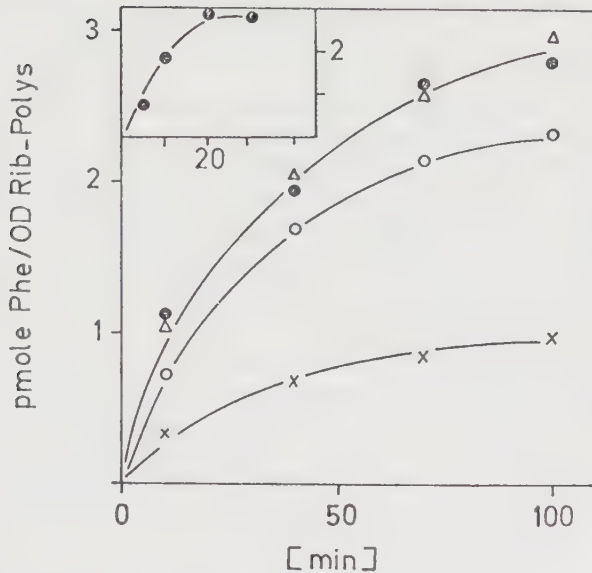
3.1.2.3 Substratkonzentration

In Abb. 5 wird das Ergebnis einer Versuchsreihe mit Variation der Phenylalanin Konzentration von 5 nMol/Ansatz bis 30 nMol/Ansatz gezeigt. Das System ist, wie daraus zu entnehmen ist, mit 20 nMol/Ansatz an Substrat gesättigt. Dies gilt für eine konstante Ribosomen-Konzentration im Ansatz von $14 \text{ OD}_{260}/\text{Ansatz}$

und eine Enzymkonzentration von 188 μ g/Ansatz. Wir haben für die späteren Experimente eine Phenylalanin-Konzentration von 5 nMol pro 2 OD₂₆₀-Einheiten an tRNA gewählt. Dies entspricht 5 nMol Phe/3.5 nMol Gesamt-tRNA oder wenn man abschätzt, daß die tRNA_{Phe} etwa den zwanzigsten Teil der Gesamt-tRNA ausmacht ca. 5 nMol Phe/0.15 nMol tRNA_{Phe}. Das wäre ausreichend um jedes tRNA Molekül während der Testdauer ca. 30 bis 50 mal neu zu beladen, je nachdem welcher Prozentsatz der gesamten eingegebenen tRNA-Moleküle im Transfer aktiv sind. Dies ist zwar, wie Abb. 5 zeigt, nicht das Maximum des mit unserem System Erreichbaren, aber es genügt, um hinreichend hohe Zählwerte zu erreichen aus denen Hemmstoffwirkungen mit genügender Genauigkeit berechnet werden können. Daher haben wir aus Gründen der Ökonomie mit den kostenintensiven markierten Aminosäuren auf Einsatz höherer Substratkonzentrationen verzichten können.

Abbildung 6 zeigt die Abhängigkeit des Systems von der Konzentration eines als Substrat angebotenen Aminosäuregemischs, das alle zwanzig Haupt-Aminosäuren enthält. Dieses Gemisch wird bei Versuchen mit endogener mRNA gebraucht. Wir variierten die Konzentration von 2.2 nMol/Ansatz bis 6.6 nMol/Ansatz. (Die relative Zusammensetzung des Gemischs ist im Teil Material und Methoden beschrieben). Auch hier läßt sich mit dem höheren Substratangebot ein höherer relativer Anteil an eingebauten radioaktiven Aminosäuren erreichen. Aber aus den gleichen ökonomischen Gründen wie oben haben wir uns auch hier dafür entschieden, die weiteren Versuche mit der Konzentration von 2,2 nMol/Ansatz durchzuführen, da das für alle späteren Verwendungszwecke hinreichend hohe Zählraten gab. Der Einschub in Abb. 6 zeigt die Inkorporationsraten bei zwei verschiedenen Magnesium-Ionen Konzentrationen. Dies soll demonstrieren, daß nach unseren Befunden das Polysomen-system (mit endogener mRNA) nicht soviel Mg⁺⁺-Ionen benötigt wie das Ribosomen-System bei Verwendung exogener mRNA.

Abb. 5: Einfluß der Substrat- (Aminosäure) Konzentration auf die zellfreie Proteinsynthese der Rattenleber



Testbedingungen: Siehe Legende der Abbildung 3.

Phenylalaninkonzentration: 5 - 30 nMol/Ansatz.

x—x 5 nMol Phe/Ansatz

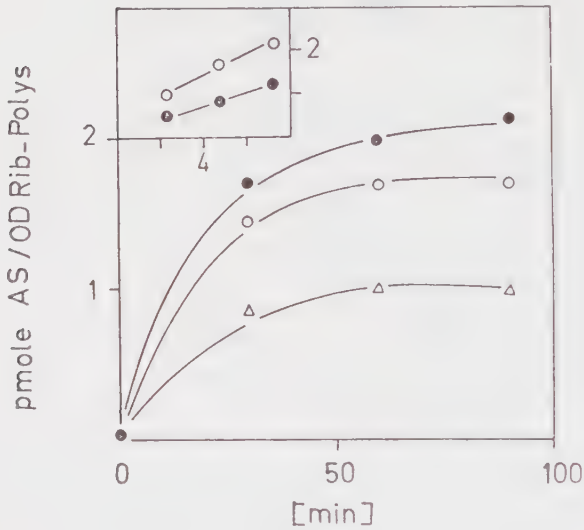
o—o 10 nMol " "

Δ—Δ 20 nMol " "

●—● 30 nMol " "

Einschub: Abhängigkeit der Incorporation von der Phenylalamin-
konzentration (nMol/Ansatz)

Abb. 6: Einfluß der Aminosäuregemischkonzentration auf die zellfreie Proteinsynthese der Rattenleber



Testbedingungen: Siehe Legende der Abbildung 3.

Δ—Δ	2.2	"nMol"	Aminosäuregemisch/Ansatz		
○—○	4.4	"	"	"	"
●—●	6.6	"	"	"	"

Einschub: Abhängigkeit der Inkorporation von der Aminosäuregemischkonzentration (in "nMol"/Ansatz)

○—○	bei 8 mM Mg^{++}
●—●	bei 14 mM Mg^{++}

3.1.2.4 tRNA-Konzentration

Da von EMMERICH und GOERTZ das Optimum der tRNA-Konzentration bei Verwendung von exogener mRNA im polyU-polyPhe-Einbautest bereits ermittelt worden war, (2 OD_{260} -Einheiten tRNA/Ansatz), haben wir uns in der vorliegenden Arbeit darauf beschränkt, nur noch das tRNA-Optimum bei Verwendung endogener mRNA zu messen (Abb. 7). Wir finden auch hier ein Optimum bei 2 OD_{260} -Einheiten tRNA/Ansatz. Der Leerwert ohne tRNA liegt ziemlich hoch. Daraus entnehmen wir, daß bis zu ca. 50% der gemessenen gesamten Einbau-Aktivität auch noch an die Ribosomen gebundene oder noch in der S 100-Fraktion enthaltene tRNA zurückzuführen sein muß. Numerische Werte für die Leerwerte ohne tRNA in den Tests für die Transfer- und Akzeptorfunktion der tRNA für verschiedene Ribosomen- und Enzympräparationen können aus Tabelle 4 ersehen werden.

Tabelle 4: Typische numerische Werte für die Kontrollen ohne tRNA bei Verwendung verschiedener Ribosomen- und Enzympräparationen.

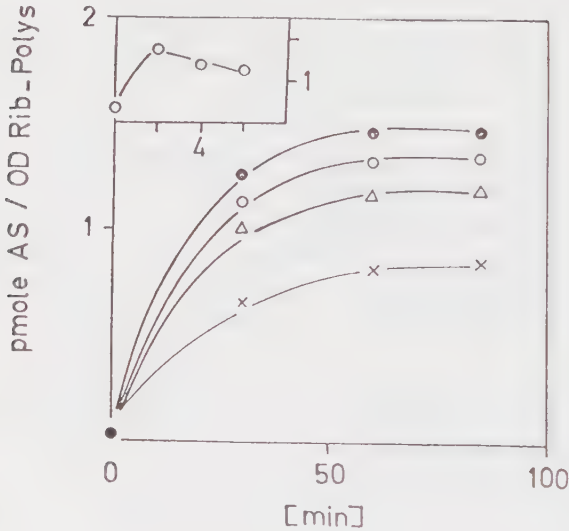
- a) Im Peptidisierungsansatz (2 OD_{260} tRNA; $150 \mu\text{g}$ Enzym; 10 - 20 OD_{260} Ribosom)

kompletter Ansatz in cpm	Leerwert in cpm	Leerwert in % des kompletten Wertes
1730	1135	65 %
1998	1654	82 %

- b) Im Aminoacyltest (2 OD_{260} tRNA; $150 \mu\text{g}$ Enzym)

kompletter Ansatz in cpm	Leerwert in cpm	Leerwert in % des kompletten Wertes
3950	639	16 %
1218	250	20 %

Abb. 7: Einfluß der tRNA Konzentration auf die zellfreie Proteinsynthese der Rattenleber



Testbedingungen: Siehe Legende der Abbildung 3. Nur keine Präinkubation und keine Zugabe von PolyU.

- X—X Leerwert ohne tRNA
 Δ—Δ 6 OD₂₆₀ tRNA/Ansatz
 ○—○ 4 " " "
 ●—● 2 " " "

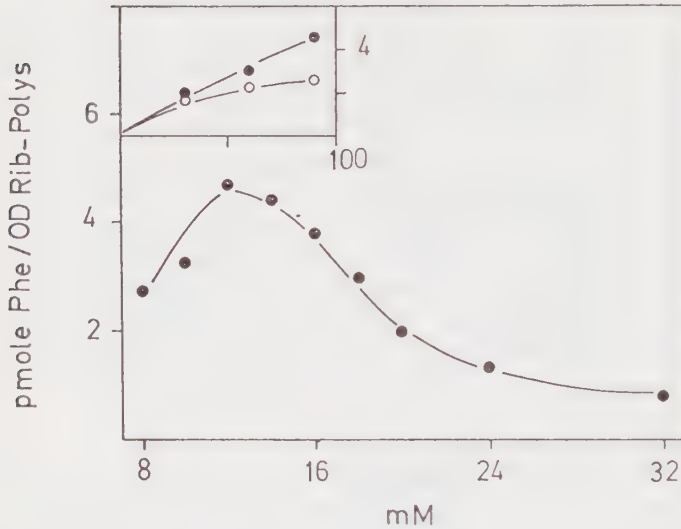
Einschub: Abhängigkeit der Incorporation von der tRNA-Konzentration (in OD₂₆₀/Ansatz)

Im Vorgriff auf später beschriebene Resultate berichten wir hier, daß im Akzeptoraktivitätstest die Leerwerte ohne tRNA (jedoch mit S 100-Fraktion) niedrig sind, während sie wie gerade beschrieben im Peptidisiertest höher lagen. Deshalb vermuten wir, daß die Enzymfraktion (S 100) weitgehend frei von tRNA-Molekülen ist, und daß die Ribosomenfraktion noch kontaminiert ist mit an den Ribosomen und Polysomen haften gebliebenen tRNA-Molekülen. Dieser Schluß ist in Übereinstimmung mit den Befunden von EMMERICH und GOERTZ, die versucht haben, die S 100-Fraktion aus tierischen Zellen und auch aus Bakterienzellen durch Passage über eine DEAE-Zellulose-Säule von tRNA zu befreien. Sie fanden keinen wesentlichen Unterschied im tRNA-Gehalt der Rattenleber S-100 Extrakte vor und nach der Säulenchromatographie. Daraus wurde geschlossen, daß die S 100-Fraktion in der Weise, wie wir sie routinemäßig präparierten, weitgehend frei von tRNA ist, was uns für die vorliegende Arbeit erlaubte, auf die Reinigung an DEAE-Zellulose zu verzichten.

3.1.2.5 Magnesium-Konzentration

Magnesium-Ionen spielen im zellfreien Einbausystem eine wichtige Rolle. Sie werden für die strukturelle Integrität der Ribosomen und für die Bindung der mRNA und der Aminoacyl-tRNA an das Ribosom benötigt. Die erforderliche Mg^{++} -Ionenkonzentration für eine optimale Proteinsynthese im tierischen System variiert erfahrungsgemäß sehr viel stärker von Präparation zu Präparation als im bakteriellen System. Die erforderliche Konzentration ist ferner abhängig vom Gehalt des Ansatzes an mRNA, ATP und GTP. Im wesentlichen Unterschied zum bakteriellen System kann man also beim tierischen System nicht ein Magnesium Optimum für eine Präparation ermitteln und sich bei späteren Präparationen darauf verlassen, daß das Optimum in etwa in derselben Größenordnung wie bei der früheren Präparation liege. Erfahrungsgemäß kann das Optimum irgendwo mit nahezu gleicher Wahrscheinlichkeit in dem Bereich zwischen 2 und 40 mM liegen. (Skriptum über zellfreie Proteinsynthese mit tierischen Systemen, AARHUS-KURSUS, 1972).

Abb. 8: Einfluß der Magnesiumkonzentration auf den zellfreien Einbau von Phenylalanin in Polyphenylalanin (Rattenleber)



Testbedingungen: Siehe Legende der Abbildung 3.

Die Magnesiumkonzentration wurde von 8 bis 32 mM variiert.

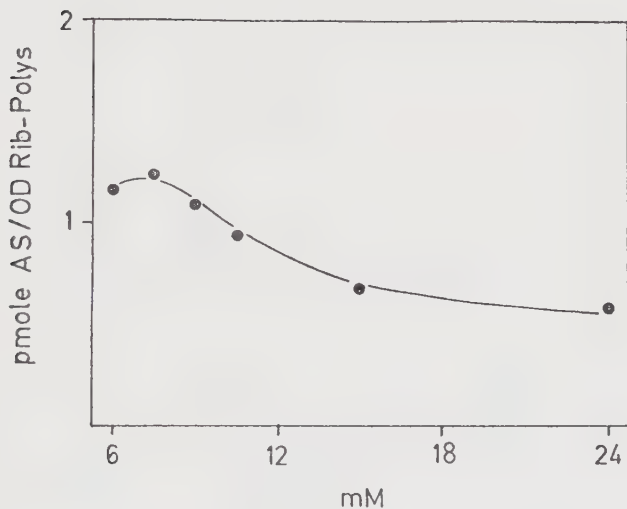
Einschub: Kinetik (90 min bei 37°C)

○—○ mit 10 mM Mg⁺⁺/Ansatz

●—● mit 12 mM Mg⁺⁺/Ansatz

Abb. 9: Einfluß der Magnesiumkonzentration auf den endogenen Einbau von AS im zellfreien Peptidisieransatz

a) Magnesiumkonzentrationsabhängigkeit



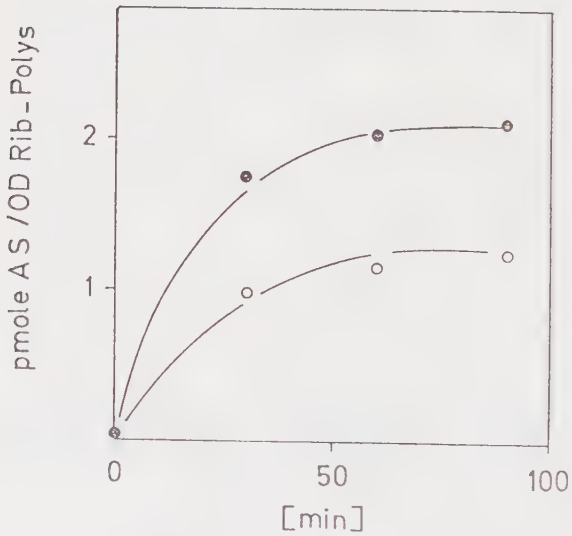
Testbedingungen: Siehe Legende der Abbildung 3.

Die Magnesiumkonzentration variiert von 6 bis 24 mM.

Keine Präinkubation und keine Zugabe von Poly U.

Abb. 9:

b) Zeitkinetik bei zwei verschiedenen Magnesiumkonzentrationen.



Testbedingungen: Siehe Legende der Abbildung 3.

Inkubation: 90 min bei 37°C. Keine Präinkubation und keine Zugabe von PolyU.

○—○ 14 mM Mg⁺⁺

●—● 8 mM Mg⁺⁺

Da das Maximum jedoch ziemlich scharf ist (Halbwertsbreite der annähernd glockenförmigen Funktion ist i.A. kleiner als 10 mM), kann man bei bloßer Abschätzung der Lage des Optimums innerhalb des wahrscheinlichen Schwankungsbereichs leicht vollkommen außerhalb des tatsächlichen Optimums liegen. Das bedeutet um eine bis mehrere Größenordnungen niedrigere Einbauraten als tatsächlich mit dem gegebenen Material erreichbar wären und damit Aussagen am Rande der Verlässlichkeit. Es ist daher bei tierischen Systemen im Gegensatz zu bakteriellen Systemen unerlässlich, für jede neue Charge das Mg^{++} -Optimum neu zu ermitteln. Dies wurde bei unseren Versuchen beachtet. Das Resultat einer typischen Bestimmung ist in Abb. 9 und Abb. 8 aufgezeichnet.

Abb. 8 zeigt ein Mg^{++} -Optimum zwischen 12 - 14 mM für das polyU-polyPhe-System. Abb. 9a zeigt ein Optimum zwischen 8 und 10 mM für das von endogener mRNA gesteuerte System. Abb. 9b zeigt die Kinetik des endogen gesteuerten Einbaus bei zwei unterschiedlichen Mg^{++} -Konzentrationen in der Nähe des Optimums.

3.1.3 Der Akzeptoraktivitätstest für tRNA aus Rattenleber

In diesem Test wird die Fähigkeit der tRNA Aminosäuren zu binden gemessen. Die Details der Durchführung des Tests sind im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. Die für diese Reaktion benötigten Synthetasen sind im S 100 Extrakt enthalten. Zunächst wurde daher die Abhängigkeit des Testsystems von der S 100 Konzentration gemessen. Das Resultat ist in Abb. 11 aufgeführt. Die Konzentration an Gesamt-S100-Protein wurde in diesem Versuch von 27 μ g/Ansatz bis 270 μ g/Ansatz variiert. Mit diesen Enzymmengen wird noch keine Sättigung des Systems erreicht, die Beladung nimmt über den ganzen Bereich mit der eingesetzten Enzymmenge noch stetig zu. Aus Gründen der Ökonomie wurde in allen späteren Versuchen mit 200 μ g S 100 Protein/ 2 OD₂₆₀ tRNA gearbeitet. YANG und NOVELLI (1968) benutzen in ihren Experimenten sehr ähnliche Enzymkonzentrationen, nämlich 200 bis 400 μ g S 100 Protein/ 2 OD tRNA.

Eine Mg^{++} -Ionenkonzentration von 5 mM wurde als optimal befunden für die Beladung mit Phenylalanin. Für Akzeptoraktivitätstests mit Aminosäuregemischen wurden Mg^{++} -Ionenkonzentrationen derselben Größenordnung benutzt. Mit diesen gegebenen Mg^{++} -Konzentrationen wurde eine ATP-Konzentration von 1 mM gewählt. Nach Erfahrungswerten aus der Literatur (SMITH und McNAMARA, '97') muß das Verhältnis Mg^{++}/ATP für Phenylalanin Beladungstests zwischen 5 und 6:1 liegen. Die tRNA-Menge wurde auf 2 OD₂₆₀-Einheiten pro Ansatz begrenzt, da die verfügbare Menge an tRNA aus mit Pactamycin behandelten Tieren limitiert war und da diese Konzentrationen im Ansatz hinreichend klare Auskünfte lieferten. Für 2 OD₂₆₀-Einheiten Gesamt-tRNA wurden 5 nMol Phenylalanin, resp. 8 nMol Lysin, 7.8 nMol Arginin oder 2.2 nMol eines Aminosäuregemischs verwendet.

3.2 Hauptversuche: Einfluß von Pactamycin auf die Komponenten der proteinsynthetisierenden Machinerie in Rattenleber

3.2.1 Die Aktivität der Ribosomen-Polysomen-Fraktion

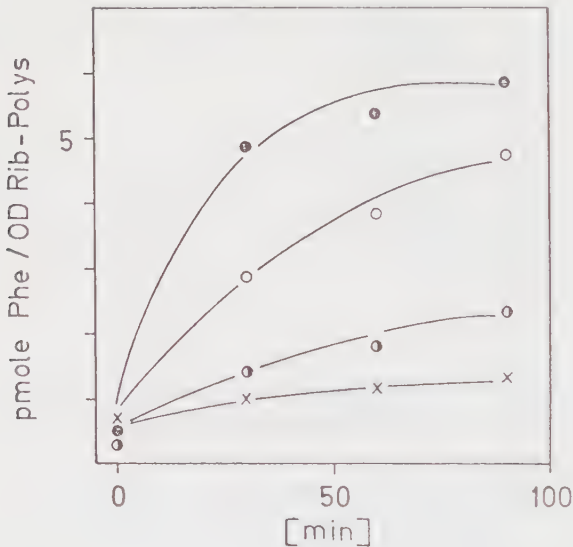
Ribosomen-Polysomen wurden aus mit 0.4 mg PA/kg und 0.7 mg PA/kg Körpergewicht behandelten Tieren und aus Kontrolltieren präpariert. Die biologische Fähigkeit dieser Präparationen Polyphenylalanin unter der Kontrolle von poly U zu synthetisieren wurde geprüft. Damit wurde die Aktivität des freien Ribosomenanteils der Präparation getestet. Abb. 10 zeigt das Resultat, die Kinetik des poly U abhängigen Phenylalanin-Einbaus in Poly-Phenylalanin mit den verschiedenen Präparaten. Nach 30 min. Inkubationszeit zeigt das Gesamtpräparat "0.7" (Ribosomen plus Polysomen) 56% der Aktivität des Kontrollpräparats und das Präparat "0.4" 28% des Kontrollleinbaus. Nach 90 min. ist die Reaktion im Kontrollansatz beendet. Zu diesem Zeitpunkt zeigt das Präparat "0.7" 80% der Kontrollaktivität und das Präparat "0.4" 40%. Auffällig an diesem Resultat ist der Befund, daß das Präparat aus den mit der höheren Dosis behandelten Tieren noch höhere Aktivität zeigt als das Präparat aus den mit der niedrigeren Dosis behandelten Tieren.

Da jedoch über die Pharmakokinetik von Pactamycin in Ratten keine experimentellen Daten vorliegen und der Repetitionsversuch dieses Experiments fehlgeschlagen ist, kann nicht entschieden werden, ob das Resultat nur "Hemmung der Aktivität mit Streuung im Bereich der Meßgenauigkeit" bedeutet oder "eine maximale Hemmwirkung im Bereich einer gewissen niedrigen Dosis mit Wiederabnahme der Hemmintensität bei höheren Dosen".

Der Leerwert ohne poly U wurde in dem in Abb. 10 gezeigten Experiment nur für die Kontrollribosomen gemessen. Das in Abb. 11 gezeigte Experiment stellt die Fortsetzung des ersten Experiments dar. Es sind nur der besseren Übersichtlichkeit halber die Resultate in zwei Zeichnungen statt in einer angeführt. Das in Abb. 11 gezeigte Experiment stellt den endogenen Einbau der beiden Präparate "0.4" und "0.7" dar, kann also in gewissem Sinn als "Leerwert ohne poly U" betrachtet werden. Zwar stimmt diese Extrapolation in der Betrachtungsweise nicht exakt, da der endogene Einbau mit einem Aminosäuregemisch gemessen wird, der poly U-abhängige Einbau nur mit Phenylalanin. Aber qualitativ ist man schon zu dieser Betrachtungsweise berechtigt, wenn man die plausible Annahme zugrundelegt, daß der "Gang" der Abhängigkeit von der Dosis bei Messung mit 20 Aminosäuren nicht entgegengesetzt verlaufen sollte wie bei Messung mit nur einer Aminosäure. Wird also etwa im endogenen Einbautest mit dem Aminosäuregemisch eine Verminderung der behandelten Ribosomen/Polysomenaktivität gegenüber dem Kontrollpräparat gefunden, so wäre es abwegig zu erwarten, daß derselbe Einbautest mit nur Phenylalanin statt des Gemisches eine Erhöhung zeigen sollte. Aus diesem Grund fühlen wir uns berechtigt, das Experiment der Abb. 11 als Fortsetzung des Experiments der Abb. 10 zu diskutieren.

Diese Experimente wurden dazu angestellt, um herauszufinden, ob die Ribosomenpräparate aus den behandelten Tieren eine spezifische Aktivitätsverminderung pro Ribosom gegenüber den Kontrollpräparaten zeigten.

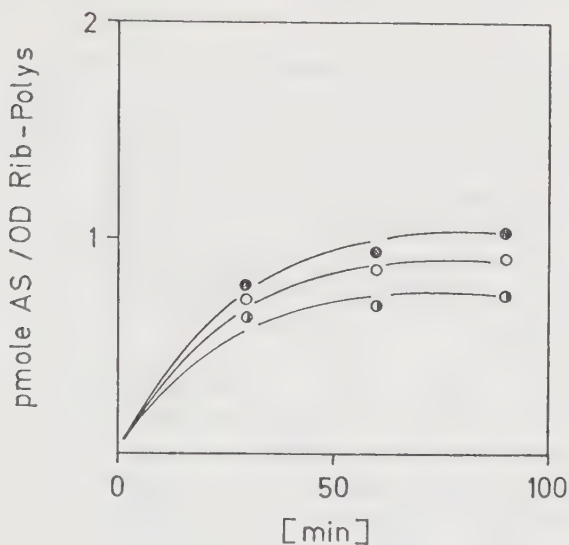
Abb. 10: Aktivitätskinetik der Leberribosomen von PA-behandelten Ratten (polyU-abhängige Polyphenylalaninsynthese)



Der Inkubationsansatz (Endvolumen = 250 μ l) enthält:
 27 μ Mol Tris-HCl pH 7.8; 3.5 μ Mol Mg-Azetat; 6.5 μ Mol KCl;
 0.1 μ Mol Dithiothreitol; 0.8 μ Mol β -Mercaptoethanol; 0.27 μ Mol
 ATP; 0.0075 μ Mol GTP; 0.5 μ Mol CP; 12.5 μ g CPK; 5 nMol
 $^{12}\text{C}+^{14}\text{C}$ Phenylalanin; 2 OD₂₆₀ Leber tRNA; 0.27 mg Enzym; 18 OD₂₆₀
 Leberribosomen; 80 μ g Poly U.

X—X Leerwert ohne Poly U
 ●—● "0.4 PA" Ribosomen-Polysomen
 ○—○ "0.7 PA" " "
 ●—● Kontroll " "

Abb. 11: Aktivitätskinetik der Leber-Polysomen von PA-behandelten Ratten (zellfreier endogener Einbau)



Testbedingungen: Siehe Legende der Abb. 12

Im Ansatz: 1.5 μ Mol Mg-Azetat; 2.2 nMol $^{12}\text{C} + ^{14}\text{C}$ As Mix;
 18 OD₂₆₀ Leberribosomen-Polysomen; kein Zusatz von Poly U,
 keine Präinkubation.

- "0.4 PA" Ribosomen-Polysomen
- "0.7 PA" " "
- Kontrolle " "

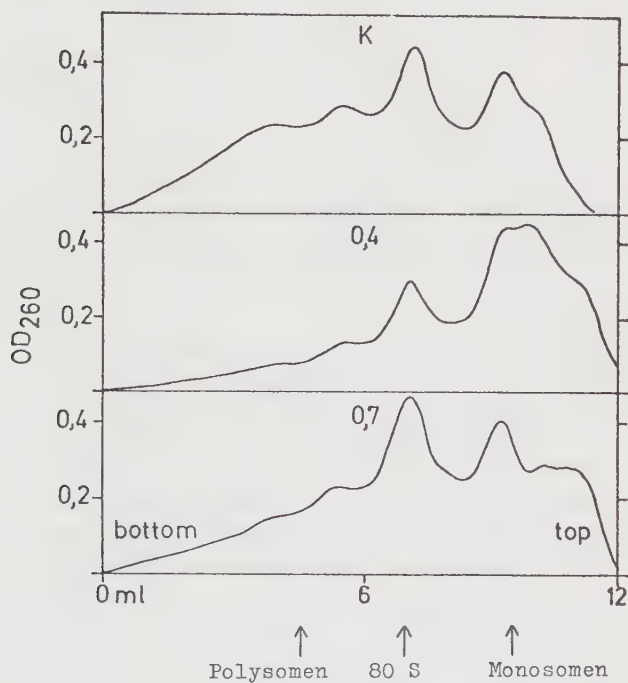
Das Resultat der Abbildung 10 für sich allein betrachtet könnte aber auf den ersten Blick auf verschiedene Weisen gedeutet werden: Einmal mit einer quantitativen, zum anderen mit einer qualitativen Erklärung.

Erklärung a) qualitativ: Die verminderte Aktivität der Gesamt-Präparation in Abb. 10 kommt nicht dadurch zustande, daß pro eingesetzte OD_{260} -Einheit weniger Ribosomen vorhanden sind, sondern durch eine verminderte Funktionsfähigkeit der freien Ribosomen. Es wird also angenommen, daß das Resultat nicht lediglich dadurch zustandekomme, daß sich in den Präparaten aus behandelten Tieren das Verhältnis Ribosomen:Polysomen zugunsten der Polysomen verschoben habe.

Erklärung b) quantitativ: Es wird angenommen, daß sich bei gleichbleibender funktioneller Qualität der Ribosomen aus den behandelten Präparaten lediglich das Verhältnis Ribosomen/Polysomen in den Präparaten als Folge der Behandlung zugunsten der Polysomen verschoben habe. Auch mit dieser Annahme könnte das Ergebnis der Abbildung 10 völlig erklärt werden. In dem dort angestellten Test wird lediglich selektiv die Funktion der freien Ribosomen erfaßt. Über die Aktivität der Polysomen kann nichts ausgesagt werden, solange die Leerwerte ohne poly U fehlen.

Mit dem Resultat der Abb. 10 allein kann also zwischen diesen beiden möglichen Erklärungen nicht eindeutig zugunsten einer davon diskriminiert werden. Genau um dieses zu erreichen wurde das in Abb. 11 dargestellte Experiment durchgeführt. Die Erwartung war, daß für den Fall der Richtigkeit von Erklärung b) eine gesteigerte Polysomenaktivität hätte gefunden werden müssen. Sollte eine solche nicht gefunden werden, so kann auch eine rein quantitative Erklärung wie im Fall b) nicht zutreffend sein.

Abb. 12: Gradientenzentrifugation der Ribosomen-Polysomenpräparationen von mit PA-behandelten Ratten.



In diesem Falle muß zur Deutung der Resultate eine dritte Möglichkeit herangezogen werden:

Erklärung c) qualitative Änderung der Funktionsfähigkeit sowohl der Ribosomen als auch der Polysomenfraktion

c1) ohne

c2) mit gleichzeitiger quantitativer Verschiebung des Ribosomen/Polysomen-Verhältnisses.

Zwischen den Versionen c1) und c2) kann wiederum mit den Resultaten der Experimente 10 und 11 allein nicht entschieden werden, sondern dazu muß abermals ein Zusatzexperiment konzipiert werden. Dies haben wir auch konsequent durchgeführt und das Resultat ist in Abb. 12 gegeben. Jedoch zunächst zur Diskussion der Abb. 11.

Wie aus der Abb. 11 ersichtlich, ist auch die Polysomenfraktion aus den mit Antibiotikum behandelten Tieren in ihrer proteinsynthetisierenden Funktionsfähigkeit gegenüber dem Kontrollpräparat vermindert. Damit scheiden die einfachen Erklärungsmöglichkeiten a) und b) aus und es bleibt nur noch die Möglichkeit c) ernsthaft zu diskutieren und nach Möglichkeit zwischen den beiden Versionen zu entscheiden.

Um dies zu können wurde das Experiment 12 durchgeführt, eine Geschwindigkeitssedimentation der Ribosomen, Polysomen-Präparate aus den verschiedenen Ausgangsmaterialien im Naccharose-Gradienten. Mit dieser Methode ist es möglich, eventuelle quantitative Verschiebungen in der Zusammensetzung auf ihren Komponenten zu erfassen.

Das Resultat (Abb. 12) zeigt:

In den beiden Präparaten aus behandelten Tieren ist der Polysomenanteil gegenüber dem Kontrollpräparat um ca. 30 - 60% erniedrigt. Das Präparat "0.4", das auch in den beiden Tests zur zellfreien Peptidsynthese die niedrigste Aktivität hatte, hat auch hier den am stärksten reduzierten Polysomenanteil.

3.2.2 Diskussion der Resultate

Bei bakteriellen Ribosomen kann es in einer Präparation aufgrund verschiedener Zusammensetzung der ribosomalen Partikel aus fractional- und unit-Proteinen (KURLAND, 1970, NOMURA, 1972) funktionell unterschiedliche Unterklassen geben. Es wäre denkbar, daß einzelne funktionelle Unterklassen durch Pactamycin-Wirkung modifiziert sind, andere dagegen funktionell unverändert. Wahrscheinlicher aber ist eine Analogie zu den Befunden aus unserer Arbeitsgruppe über den Wirkungsmechanismus von Tetrazyklinen an bakteriellen Ribosomen. Bei Verwendung eines sehr sensiblen Fluoreszenztestes wurde dort gefunden, daß an den Ribosomenpräparaten noch anhaftendes Antibiotikum nachweisbar ist, wenn die Ribosomen aus Keimen präpariert wurden, die in Gegenwart minimaler Hemmkonzentrationen des Wirkstoffes gewachsen waren (G.FEY, persönliche Mitteilung). Wenn der Präparationsgang einen Reinigungsschritt der Ribosomen durch Saccharose enthielt, fand sich ein Molekül Tetrazyklin pro drei 30 S Ribosomen Untereinheiten. Diese Resultate konnten später durch Verwendung radioaktiven Tetrazyklins bestätigt werden. Es wurde gefunden, daß im zellfreien Peptidsynthese-System (mit poly U) von E. coli diese Ribosomen bis zu 30% geringere Aktivität besaßen als Kontrollribosomen. Es ist daher durchaus denkbar, daß auch die verminderte Funktionsfähigkeit der Rattenleber-Ribosomen aus Pactamycin-behandelten Tieren auf zum Teil anhaftendes Antibiotikum zurückzuführen ist und nicht auf eine strukturelle Änderung der Ribosomen bzw. deren Untereinheiten.

In einer Bindungsstudie mit radioaktivem Pactamycin fanden COHEN, GOLDBERG und HERNER (1969), daß selbst nach Äthanolpräzipitation des PA-Ribosomenkomplexes nach Sedimentation im Saccharose-Gradienten noch ca. ein Molekül Pactamycin pro drei 30 S Untereinheiten gebunden war (E. coli Ribosomen). In einer analogen Studie mit Ribosomen und Polysomen aus Kaninchen-Retikulozyten finden MAC DONALD und GOLDBERG (1970), daß maximal bis zu ein Molekül PA an der kleinen Ribosomen-Untereinheit bei 0° verbleibt. Diese Zahlenangaben stimmen relativ gut mit den für Tetrazyklin gefundenen Werten überein.

Daß Pactamycin sich an Ribosomen in Eukaryonten bindet, wurde von COLOMBO, FELICETTI und BAGLIONI (COLOMBO et al, 1966) an intakten Kaninchen-Retikulozyten gezeigt. In intakten Zellen wurde die Proteinsynthese durch vorherige Inkubation der Retikulozyten mit PA drastisch gesenkt. Dieser Effekt wurde auch für Cycloheximid und Streptovitacin gefunden. Während jedoch durch dreimaliges Waschen in einer physiologischen Salzlösung der Cycloheximid-Hemmeffekt wieder aufgehoben und die Proteinsynthese-Aktivität wieder hergestellt werden konnte, war dies für Streptovitacin und Pactamycin nicht möglich. Die Autoren ziehen daraus den Schluß, daß die letzten beiden Antibiotika leicht in die Zelle eindringen, aber nicht wieder aus ihr entlassen werden können. Es muß also irgendeine Zellstruktur diese Wirkstoffe relativ fest binden. Das gebundene Material bleibt ferner hemmaktiv auf die Proteinbiosynthese. Da die Bindung von PA an Ribosomen nachgewiesen ist, liegt es nahe, die Ribosomen als Bindungspartner anzunehmen. Die Beobachtungen von G.FEY, COHEN und GOLDBERG, MAC DONALD und GOLDBERG und COLOMBO, FELICETTI und BAGLIONI sprechen dafür, daß auch bei den Versuchen am Ganztier berücksichtigt werden muß, daß Pactamycin nach Isolierung aus der Leber Pactamycin-behandelter Tiere an Ribosomen gebunden bleibt. Leider konnten wir keine Versuche mit radioaktivem Pactamycin durchführen, da uns dieses nicht zugänglich war. Die Autoren, die dieses Material verwendeten, haben es von BHUYAN (Uphohn Company, Calamozoo, Michigan) erhalten. Da Pactamycin auch keine starke Fluoreszenz oder andere charakteristische optische Eigenschaften besitzt, die zum Nachweis sehr kleiner Konzentrationen herangezogen werden könnten, konnten wir bisher nicht entscheiden, ob die verminderte Ribosomen-Aktivität auf anhaftendes Pactamycin oder Veränderung der Ribosomen-Struktur zurückzuführen ist. Jedoch halten wir es nicht für wahrscheinlich, daß das gesamte Ausmaß der verminderten Funktionsfähigkeit unserer Präparate auf noch gebundenes Pactamycin zurückzuführen ist. Dazu waren die in die Ratten injizierten Dosen zu gering und das beobachtete Maß des Aktivitätsverlustes von Pactamycin-Präparaten zu groß. Die

verminderte Aktivität der Ribosomen kann daher nicht allein auf Spuren gebundenen Antibiotikums zurückgeführt werden.

Für einen spezifischen Hemmstoff der Initiation ist zu erwarten, daß unter seinem Einfluß der Polysomen-Anteil in den Zellen abnimmt. Als Initiations-Hemmstoff sollte er ja nur die Neuinitiation, also die Neubildung von Polysomen verhindern, nicht aber Elongation, Termination und Dissoziation der Polysomen nach beendeter Translation. Die verschiedenen Arbeitsgruppen gingen in der Praxis im allgemeinen so vor, daß sie entweder ganze Zellen mit dem Hemmstoff inkubierten (COLOMBO et al., 1966, LODISH et al., 1971) oder Zellysate (GOLDBERG et al., 1971) und dann die Polysomenfraktionen auf Zuckergradienten analysierten. COLOMBO und Mitarbeiter (1966) inkubierten intakte Kaninchen-Retikulozyten 15 min. bei 37° mit 9×10^{-5} M PA und fanden eine Polysomendegradation. Die Menge des absorbierenden Materials im Polysomenbereich des Gradienten nimmt ca. um ein Drittel ab, und eine entsprechende Menge Materials taucht unter dem Monosomengipfel wieder auf. Mit Ausnahme des deutlich verstärkten Monosomengipfels sehen sich die Polysomenbereiche von Präparaten aus Kontroll- und behandelten Tieren qualitativ sehr ähnlich. Die Polysomendegradation ist also mit dem vielzitierten Resultat von COLOMBO et al. nicht sehr deutlich zu belegen. Auch das Resultat von LODISH und Mitarbeitern (1971) ist nicht ganz eindeutig zu interpretieren. Sie inkubierten Kaninchen-Retikulozyten-Lysate für 3 min. bei 25°C mit verschiedenen PA-Konzentrationen. Eine Konzentration von 4.2×10^{-7} M PA führt zu einer deutlichen Abnahme der optischen Dichte im Polysomenbereich, jedoch ohne die zu erwartende einhergehende Zunahme im Monosomenbereich oder im Bericht der Untereinheiten. Noch erstaunlicher ist, daß bei einer Konzentration von 1.6×10^{-5} M PA keine Veränderung des Polysomenprofils im Vergleich zur Kontrolle mehr gefunden wird. Wenn diese Resultate zuverlässig sind, lassen sie sich nur so verstehen, daß geringe Konzentrationen des Hemmstoffes zu einem Polysomenabbau führen, höhere jedoch nicht mehr. Aus beiden Arbeiten kann also mit einiger Sicherheit nur der Befund erhoben

werden, daß unter PA-Einfluß Polysomendegradation auftritt. Die Bedingungen, unter denen eine Polysomendegradation auftritt, lassen sich zur Zeit noch nicht exakt angeben. LODISH et al. (1971) erklären ihre Befunde dahingehend, daß bei der höheren Hemmstoffkonzentration die Ribosomen an messenger-RNA fixiert bleiben, daß also die spezifische Initiationshemmung durch Pactamycin ebenfalls nur in einem gewissen intermediären Konzentrationsbereich gilt. Sollte dies richtig sein, so könnten die oben erwähnten Befunde von COLOMBO et al. (1966) einfach dadurch erklärt werden, daß diese Autoren eine zu hohe PA-Konzentration benutzten, um den Polysomenabbau noch deutlich sichtbar machen zu können. Die Resultate von GOLDBERG und Mitarbeitern (1971) an Rattenretikulozyten-Lysaten scheinen diese Befunde von LODISH et al. zu bestätigen. Die letzte Gruppe inkubierte die Extrakte für 2.25 min. mit 5×10^{-7} M PA und fand eine Polysomendegradation, jedoch keine Degradation bei einer PA-Konzentration von 1×10^{-5} M PA. Unser Resultat (Abb. 12) zeigt eine gewisse Übereinstimmung mit den eben beschriebenen Resultaten anderer Autoren. Wir finden in Rattenleber eine größere Abnahme des Polysomenanteils (allerdings bei gleichzeitiger Zunahme des Monosomenanteils) bei Tieren, die mit einer mittleren Dosis PA behandelt wurden, als bei Tieren, die eine höhere Dosis erhielten. Obwohl uns die Pactamycin-Konzentration in der Leber nicht bekannt ist, können wir festhalten, daß auch wir eine Abnahme der Polysomen vorzüglich innerhalb eines mittleren Konzentrationsbereiches an Hemmstoff finden. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß auch die Ribosomen:Polysomencharge, die aus Rattenleber von Tieren stammte, die mit einer mittleren Dosis behandelt wurden, im Einbautest am wenigsten aktiv war. Dieser Befund wäre mit der Vorstellung vereinbar, daß in dieser Präparation der Polysomenanteil kleiner ist als in der Präparation aus Kontrolltieren.

Für das Poly U-poly Phe-System haben wir Ergebnisse, die mit denen von BHUYAN (1967) vergleichbar sind. Außer uns ist dies der einzige Autor, der die Wirkung von Pactamycin auf ganze Tiere in der uns zugänglichen Literatur beschrieben hat. Er injizierte

während einer Period von drei Tagen zweimal am Tag 0.7 mg PA/kg Körpergewicht und fand eine erniedrigte Einbaufähigkeit der Leberribosomen, gemessen im zellfreien poly U-poly Phe-System. Die Ribosomen aus Leber behandelter Tiere zeigten nur 40% der Aktivität von Leberribosomen unbehandelter Tiere. Diese Angaben sind mit den unsrigen sehr gut zu vergleichen, wenn berücksichtigt wird, daß BHUYAN 20 min. bei 37°C inkubierte, wir 30 min.

Tabelle 5: Aktivität der "PA"-Ribosomen im Vergleich zu Kontroll-Ribosomen (M.FEY)

Ribosomen-Poly- somen-Präparation	pMol Phe / OD _{Ribosomen-Polys.}	%
Kontrolle	4,87	100
0,7 mg PA/kg	2,86	58
0,4 mg PA/kg	1,38	28

3.2.3 Transfer-Ribonukleinsäuren aus mit Pactamycin behandelten Tieren

3.2.3.1 Vorbemerkungen

Im folgenden Abschnitt werden Resultate von Versuchen beschrieben, in denen die Funktion der Gesamt-tRNA-Präparationen aus Lebern von unbehandelten und mit Pactamycin behandelten Tieren untersucht wurden. Es wurden zwei Funktionen gemessen: Die Methylierbarkeit der tRNAs und die Akzeptorfunktion für Aminosäuren. Dieser Vergleich wurde durchgeführt mit dem Gesamtgemisch der tRNAs, das mindestens 40 verschiedene tRNA-Spezies enthält. Eine vollständige Analytik eines tRNA-Gemisches mit etwa 60 oder noch mehr tRNA-Spezies ist zwar möglich, jedoch mit den verfügbaren Methoden außerordentlich aufwendig. In einem tRNA-Gemisch können aber einzelne, besonders gut meßbare tRNA-Spezies in ihrer Funktion analytisch überprüft werden.

Eine besonders interessante Frage war, ob in Analogie zu der von H. KERSTEN (1971) und MANN und HUANG (1973) beschriebenen Situation bei Mikroorganismen auch bei höheren ^{oder Chloramphenicol} Organismen als Folge der Behandlung mit Pactamycin/isoakzeptierende Spezies für tRNA_{Phe} auftreten.

Für die Isolierung der tRNA aus Leber haben wir die von AVITAL und ELSON (1971) für Mikroorganismen ausgearbeitete Methode zur Präparation von Eukaryonten-tRNA angewandt. Diese Methode basiert auf einer Phenolextraktion und einer anschließenden selektiven LiCl-Fällung zur Trennung der tRNA von anderen stabilen rRNA-Typen. Bei einer Durchsicht von Literaturdaten war uns aufgefallen, daß die Ausbeuten von tRNA-Präparationen mittels Phenolextraktion selten über 50% der insgesamt in der Zelle enthaltenen tRNA-Mengen erreichen. Diese Literaturdaten für tRNA-Präparationen aus Mikroorganismen und Eukaryonten wurden in der Tabelle 6 zusammengestellt.

Wenn ein Extraktionsverfahren nicht die Hälfte des vorhandenen Zellmaterials zu gewinnen erlaubt, dann besteht allgemein die

Gefahr, daß es sich bei dem Präparat nicht um einen repräsentativen Querschnitt des gesamten Materials handelt, sondern einzelne Unterfraktionen Resultate insbesondere dann verfälschen, wenn sich unter dem Einfluß von Pactamycin z.B. die Extrahierbarkeit der tRNA ändern würde.

Tabelle 6: Ausbeuten von tRNA-Praeparationen aus verschiedenen Organismen

Organismus	Autor	Gesamt RNA-Gehalt mg/100gr	t-RNA-Gehalt ¹⁾ mg/100gr	tRNA-Ausbeute mg/100gr	% tRNA-Ausbeute v. Gesamt tRNA-Gehalt
E.Coli	Zahn	19% v. Trocken- gewicht	2000		
	Watson		1000-1500		
	Tissieres			100	≥ 10
	Zubay			200	≥ 20
	Avital+ Elson			185-240	≥ 19-24
	Hancher etal	"crude tRNA" (1969)		300-400	30-40
Hefe	Zahn	4500	400-600		
	Holley			100	10-20
Kalb	Kelmers (1972)	"crude tRNA"		100-200	
Ratten- leber	Leslie Adulte Ratten	900-1000	100-150		
	Junge Ratten	600-1000	60-150		
	10-180 Tage				
	nach parti- eller Hepatec- tomie	900-1000	100-150		
	Fischer	660-910	70-140		
	Zahn	960-1130	100-150		
	Brunngraber (1962)			60*	≈ 60
	Delihias Staehelin (1966)			20	≈ 20
	Sein et.al. 1969			60	≈ 60
	M.Fey 1972			7.0-20	≈ 7.0-20

1) berechnet nach der sowohl für Mikroorganismen als auch für Eukaryonten (DARNELL, 1968) gültigen Relation:
tRNA = 10-15% des Gesamt-RNA-Gehaltes der Zelle.

3.2.3.2 tRNA-Ausbeuten unserer Präparationen im Vergleich zu Literaturwerten

In Tabelle 7 sind die Ausbeuten an tRNA für acht verschiedene Präparationen aus unterschiedlichem Ausgangsmaterial dargestellt. Die Daten sind das Resultat von zwei kompletten Versuchsserien: In einem zeitlichen Abstand von mehreren Wochen wurden jeweils fünf Tiere mit 0,2 mg PA, 0,4 mg PA, 0,7 mg PA pro kg Körpergewicht gespritzt. Aus der Tabelle geht hervor, daß im Vergleich zu tRNA-Präparationen aus Lebern von unbehandelten Kontrolltieren die Ausbeuten an tRNA aus den Lebern behandelter Tiere ansteigen, und zwar in Abhängigkeit von der Dosis. Die Ausbeute an tRNA von den mit der höchsten Dosis behandelten Tieren ist dreimal so hoch wie bei den Kontrolltieren.

Tabelle 7: t-RNA Gehalte aus Rattenleber von Kontrolltieren und von Tieren, die mit verschiedenen Dosen Pactamycin behandelt wurden.

tRNA Präparation	gr. Leber	mg tRNA pro Präparation	mg tRNA/ 100 gr. Leber
Kontrolle	50	2,8	5,6
"	84	6,6	7,8) 6,7
0,2 mg PA	64	6,1	9,5
"	36	4,0	9) 9,2
0,4 mg PA	50	4,4	8,8
"	55	6,8	12) 10,4
0,7 mg PA	50	11	22
"	30	7,3	24,2) 23

Diese Resultate erinnern an Befunde bei Prokaryonten. Es wurde gezeigt, daß Hemmstoffe der Proteinsynthese, die mit Ribosomen wechselwirken, zu einer Entkopplung von RNA- und Proteinsynthese

führen. Hierbei kommt es zu einer Akkumulation von RNA in den Zellen, die sich durch quantitative Bestimmungen des RNA-Gehaltes messen lassen. Viele Autoren haben dieses Phänomen beschrieben: DAGLEY et al., 1962, SELLS, 1964, HOSOKAWA und NOMURA, 1965, KERSTEN et al., 1967. Auch bei höheren Organismen ist ein ähnliches Phänomen bereits beschrieben worden: HOLLAND, 1963, TAMAOKI und MÜLLER, 1963, LATHAM und DARNELL, 1965, WARNER et al., 1966, ENNIS, 1967, SOEIRO et al., 1968, MANDAL, 1969, WILLEMS et al., 1969. Bei all diesen Autoren wurde hauptsächlich die Accumulation ribosomaler RNA studiert, gelegentlich aber auch ein Hinweis auf die Accumulation der tRNA gegeben. Daraus resultiert, daß bei höheren wie bei niederen Organismen die Hemmung der Proteinsynthese durch Ribosomen-Hemmstoffe nicht zu einer gleichzeitigen Hemmung der Gesamt-RNA-Synthese führt. Während die Reifung ribosomaler Vorläufer-Partikel zur intakten Ribosomen oft nicht vervollständigt wird, läuft die Synthese von tRNA und von mRNA in den meisten berichteten Fällen ungehemmt weiter.

Um sicherzustellen, daß es sich bei der erhöhten Ausbeute von tRNA aus Rattenleber von mit Pactamycin behandelten Tieren auch wirklich um tRNA handelt und nicht um Kontamination durch 7 S oder 5 S-RNA oder Abbauprodukte, wurden tRNA-Präparate aus Kontrolltieren und behandelten Tieren in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Hierbei wurde das tRNA-Präparat aus den mit der höchsten Dosis behandelten Tieren (tRNA "PA 0,7") und die tRNA aus Kontrolltieren miteinander verglichen (Abb. 13).

Nach diesen Untersuchungen lassen sich keine Unterschiede zwischen Kontroll-tRNA und tRNA aus behandelten Tieren ableiten. Da also das Präparat aus den behandelten Tieren keine Anreicherung an Abbauprodukten gegenüber der Kontrolle zeigt und ebenfalls keine nennenswerten Verunreinigungen, schließen wir, daß die Ausbeute an tRNA aus Rattenleber nach Behandlung der Tiere mit Pactamycin tatsächlich erhöht ist. Es könnte sich höchstens noch um eine RNA-Spezies handeln, die sich sowohl in ihrer Löslichkeit in Lithium-Chlorid und bei der Gelelektrophorese exakt wie tRNA verhält. Eine solche Verunreinigung würde sich aber von der tRNA dadurch unterscheiden, daß sie nicht in der Lage ist, in einem entsprechenden Testsystem in vitro Aminosäuren zu akzeptieren.

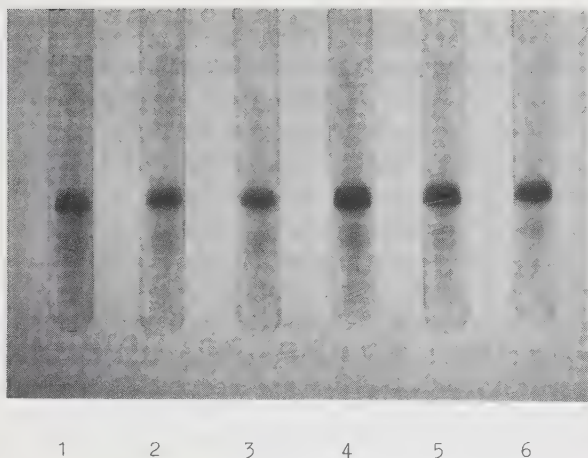


Abb. 13: Elektrophoretisches Verhalten behandelter und unbehandelter tRNAs.

1	Kontroll tRNA	0,5	OD ₂₆₀ /Röhrchen	
2	" "	0,4	"	"
3	" "	0,37	"	"
4	tRNA "PA 0.7"	0,5	"	"
5	" "	0,4	"	"
6	" "	0,37	"	"

Bevor die Resultate dieser Versuche im Kapitel 3.2.3.3 näher beschrieben werden, soll die tRNA-Ausbeute, die wir erhalten haben, mit den in der Literatur angegebenen Werten verglichen werden.

Von anderen Autoren erzielte tRNA-Ausbeuten aus Mikroorganismen und Eukaryonten, speziell Rattenleber, sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die Präparations-Verfahren waren verschieden, aber alle enthielten einen Phenolextraktionsschritt. Aus einer größeren Zahl von Arbeiten wurde jeweils eine für ein Präparations-Verfahren repräsentative Arbeit ausgewählt.

Die Auswahl erfolgte nach der kompetenten Darstellung von KIRBY in seinen Review-Artikeln (KIRBY, 1964 und KIRBY 1968). Eine gute Zusammenstellung über den Gehalt verschiedener Zellen und Gewebe finden sich auch in dem Artikel "The Nucleic Acid contents of tissues and Cells" von LESLIE (Leslie, 1955) im zweiten Band von Chargaff und Davidson, The Nucleic Acids, und zum anderen in der Zusammenstellung von R.K. ZAHN (Zahn, 1964) im zweiten Band des Biochemischen Taschenbuches von Rauen. In beiden Zusammenstellungen finden sich nur Angaben über den Gehalt an Gesamt-Ribonukleinsäuren. Hieraus kann jedoch der Gehalt an tRNA einigermaßen genau berechnet werden, da sowohl für Mikroorganismen (WATSON, 1970) als auch für Eukaryonten (DARNELL, 1968) gilt:

$$\text{tRNA-Gehalt} = 10 - 15 \% \text{ des Gesamt-RNA-Gehaltes der Zelle.}$$

Mit dieser Relation wurden aus den Angaben von LESLIE und ZAHN, die im übrigen recht gut übereinstimmen, die in Spalte drei der Tabelle 6 angegebenen Gesamtgehalte der Zellen an tRNA ausgerechnet. An diesem Punkt ist es wichtig, darauf hinzuweisen, daß die Gesamt-RNA-Gehalte und die obige Relation nicht auf dem Wege über die separate tRNA-Präparation mit Phenol erhalten wurden, da wir sie sonst nicht zur Kontrolle der Ausbeuten dieser Methode benutzen könnten. Diese Angaben stammen vielmehr aus Gesamtextraktionen von Nukleinsäure mit anderen Verfahren, die höhere (quantitative) Ausbeuten liefern und durch Bestimmung von Ribose-Phosphat. Die Relation wurde aus Sedimentationsprofilen und anderen analytischen Profilen (Säulenelutionen) an Gesamt-RNA-Präparaten hergeleitet, von denen es zuvor sichergestellt war, daß sie einen repräsentativen Querschnitt der Gesamt-RNA der Zelle enthielten.

Beim Betrachten der letzten Spalte der Tabelle fällt auf, daß die tRNA-Ausbeuten mit Phenolextraktion bei E. coli und Hefe nirgends über 40% der insgesamt vorhandenen tRNA liegen, bei Rattenleber nirgends über 60%, in der Mehrzahl der Fälle auch hier weit unter 50%.

Damit besteht im Prinzip für alle diese Arbeiten die anfangs erwähnte Möglichkeit präferentieller Extraktion einzelner Untergruppen von tRNA. Für die Mehrzahl der in diesen Arbeiten behandelten Fragestellungen bedeutet dies keinen Nachteil, wenn man etwa wie HOLLEY nur von einem tRNA-Typ möglichst große Mengen gewinnen will. Es ist jedoch erstaunlich, daß auch in analytischen Arbeiten, die die Gesamtzusammensetzung von tRNA-Extrakten vor und nach Variation irgendeines experimentellen Parameters untersuchten, fast nirgends auf diesen Punkt hingewiesen wird.

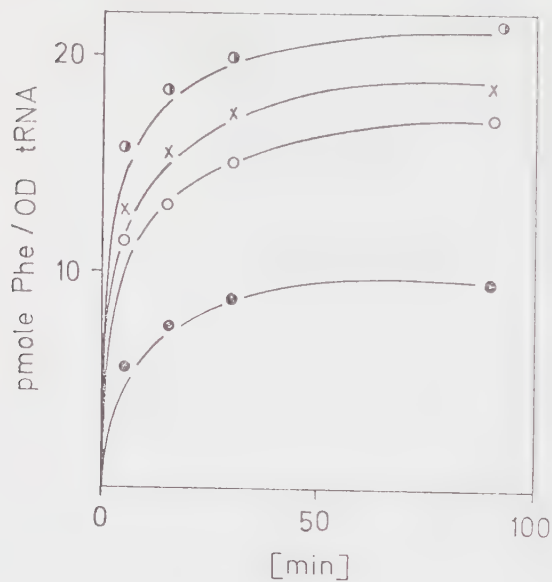
3.2.3.3 Akzeptoraktivität der Transfer-Ribonukleinsäuren

Die tRNA-Präparationen aus Rattenlebern unbehandelter und mit Pactamycin behandelter Tiere wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, sich mit verschiedenen Aminosäuren beladen zu lassen. Die Akzeptoraktivitäten dieser Gesamt-tRNA-Präparationen wurden mit Phenylalanin, Lysin und Arginin und mit einem Gemisch von 20 Aminosäuren getestet. Aus den Abbildungen 14 bis 16 geht hervor, daß sich die tRNA-Präparate aus behandelten Tieren mit Phenylalanin um 30 % höher, mit Lysin um 35% und mit dem Gesamt-aminosäuregemisch um 55% höher beladen lassen als die tRNA-Präparate aus unbehandelten Tieren. Für Arginin zeigen die PA-tRNAs eine niedrigere Akzeptorfähigkeit als die Kontroll-tRNAs (Abb. 17).

Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, erhalten wir unter den früher (Abschnitt 3.1.3) beschriebenen optimalen Testbedingungen mit Kontroll-tRNA aus zwei getrennten Versuchsserien Akzeptoraktivitäten für Phenylalanin von 10 respektive 15 pMol/OD₂₆₀ Gesamt-tRNA. Die Aktivität des Kontrollpräparates aus einer dritten unabhängigen Versuchsserie fällt in diesen Streubereich.

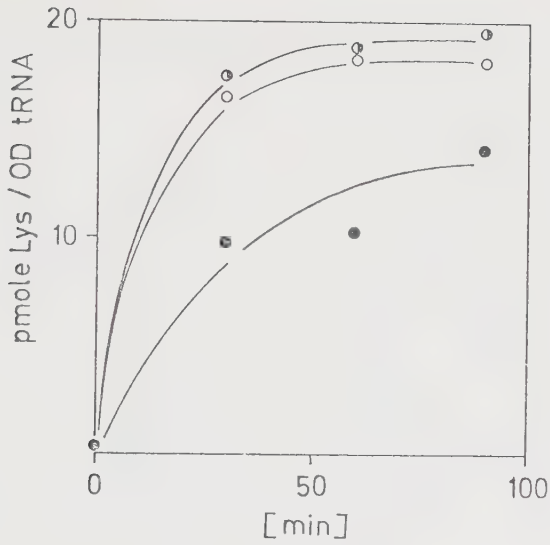
EMMERICH und GOERTZ (persönliche Mitteilung) fanden für Rattenleber-tRNA aus sehr jungen Ratten unter sonst ähnlichen Testbedingungen Werte zwischen 20 und 24 pMol Phe/OD₂₆₀ Gesamt-tRNA. Damit stellt sich die Frage, ob die tRNA aus behandelten Tieren sich besser beladen läßt als die Kontroll-tRNA, oder ob nur die Kontrollen schwanken, und sich die tRNAs aus den behandelten Tieren optimal beladen lassen.

Abb. 14: Einfluß von Pactamycin auf die Akzeptoraktivität für Phenylalanin.



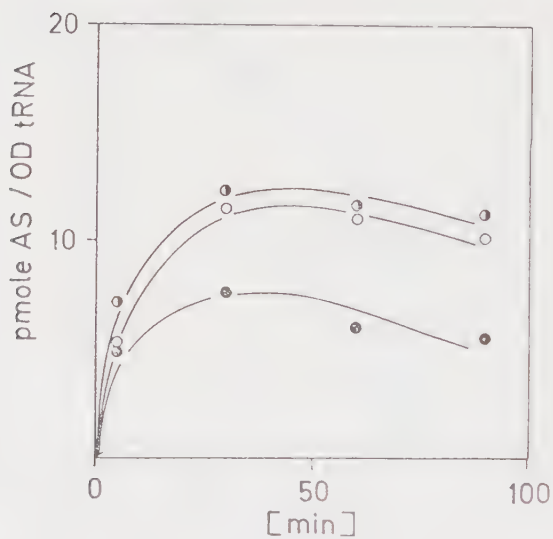
- Kontroll tRNA
- "0,7" tRNA
- ◐—◐ "0,4" tRNA
- X—X "0,2" tRNA

Abb. 15: Einfluß von Pactamycin auf die Akzeptoraktivität für Lysin



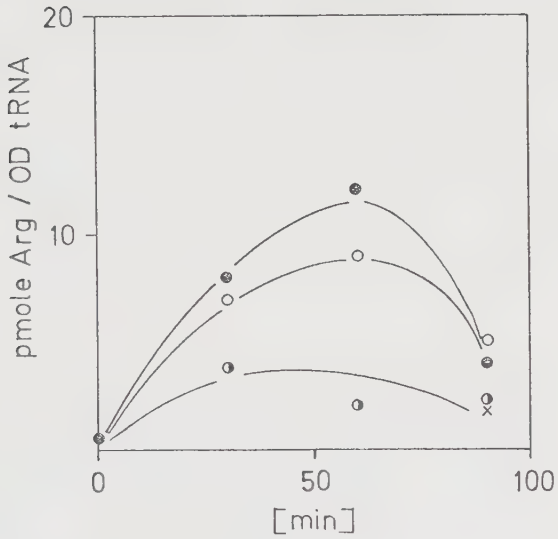
- Kontroll tRNA
- "0,7" tRNA
- "0,4" tRNA

Abb. 16: Einfluß von Pactamycin auf die Akzeptoraktivität
für ein Gemisch von Aminosäuren.



- Kontroll tRNA
- "0,7" tRNA
- ◐—◐ "0,4" tRNA

Abb. 17: Einfluß von Pactamycin auf die Akzeptoraktivität für Arginin.



- Kontroll tRNA
- "0,7" tRNA
- "0,4" tRNA

Wenn die Proteinsynthese durch Hemmstoffe, die mit den Ribosomen wechselwirken, inhibiert wird, werden alle tRNAs in der Zelle noch mit Aminosäuren beladen. Das würde bedeuten, daß in behandelten Tieren der Beladungszustand der tRNAs mit Aminosäuren höher sein könnte als in unbehandelten Tieren. Diese aminoacylierten tRNAs sind ^{möglicherweise} gegenüber solchen Enzymen, die das CCA-Ende einer tRNA اسپalten, resistenter. Dadurch könnten in einer tRNA-Population aus behandelten Tieren mehr tRNAs enthalten sein, die ein intaktes CCA-Ende haben. Dieses CCA-Ende ist für die Bindung der Aminosäure an die tRNA unerlässlich. Die Erhöhung der Akzeptoraktivität der tRNAs für Aminosäuren könnte als Effekt der Pactamycinbehandlung der Tiere aufgefaßt werden. Als Resultat unserer Versuche müssen wir festhalten, daß sich tRNA-Präparate aus Tieren, die mit Pactamycin behandelt wurden, optimal mit Aminosäuren beladen lassen.

3.2.3.4 Die Methylierbarkeit der Transfer-Ribonukleinsäuren

Es sollte untersucht werden, ob auch bei Eukaryonten, wie bei Prokaryonten unter dem Einfluß von Pactamycin tRNA-Populationen synthetisiert werden, die in einem in vitro System mit S-Adenosylmethionin als Coenzym und homologen tRNA-Methyltransferasen methyliert werden können. Der Test besteht darin, zu messen, wieviele Methylgruppen die verschiedenen tRNA-Präparate in vitro von S-Adenosylmethionin übernehmen. Der Test wurde mit verschiedenen tRNA-Präparaten aus Lebern behandelter und unbehandelter Tiere untersucht. Als Standard diente eine methylgruppendifiziente tRNA aus E. coli met⁻ rel⁻.

Methylaseaktivitäten in Extrakten aus Eukaryonten sind bisher nur mit heterologem Substrat, d.h. mit tRNA-Präparaten aus niederen Organismen getestet worden. Der Grund hierfür ist nach CRADDOCK (Craddock, 1970) darin zu sehen, daß homologe Substrate in vitro nicht mehr methylierbar sind, da die Seiten, die von den zugehörigen Enzymen spezifisch erkannt und methyliert werden, in vivo bereits methyliert worden sind. Zwar können heterologe System von

Eukaryonten konstruiert werden (KERR, 1970), jedoch wird in solchen Systemen nur ein niedrigeres Sättigungsniveau der nachträglichen Methylierung als mit Prokaryonten-tRNA als Substrat erreicht. Eines der Ziele dieser Arbeit war es daher, wie in der Einleitung beschrieben, zu versuchen, ein besseres Substrat für homologe Eukaryonten-Testsysteme zu entwickeln. Die Resultate dieser Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	pMol CH ₃ /OD ₂₆₀ tRNA		in % der Kontrolle	
	mit 150 µg Protein	mit 300 µg	mit 150 µg	mit 300 µg
K-tRNA	13	20,2	100	100
"O,2" tRNA	15	23,4	115	116
"O,4" tRNA	19,6	32,6	150	160
"O,7" tRNA	45	40,4	346	200
Met ⁻ E.Coli tRNA	25	37	190	184

Die Versuche ergaben, daß im Gegensatz zu Prokaryonten-tRNA eine tRNA aus Rattenleber sich in einem homologen System nachmethylieren läßt. Unter den in Material und Methoden gegebenen Testbedingungen nimmt eine Rattenleber-tRNA aus Kontrolltieren bei einer Inkubationsdauer von 120 min. unter Verwendung von 150 µg Protein (Rohextrakt von tRNA-Methyltransferasen) 13 pMol CH₃-Gruppen/1,8 nMol tRNA (= 1 OD) auf. Mit 300 µg Protein betrug die Aufnahme 20 pMol CH₃/1,8 nMol tRNA. Die tRNAs aus den Rattenlebern behandelte Tiere nahmen unter den gegebenen Versuchsbedingungen bis zu 100% mehr Methylgruppen auf als die Kontroll-tRNA.

Dieses könnte ein erstes Indiz dafür sein, daß ähnlich wie in Prokaryonten Pactamycin auch in Eukaryonten zu einer Entkopplung der Synthese von RNA und der nachfolgenden Methylierung führt.

Die Resultate dieser Versuche müssen aber mit äußerster Vorsicht und Kritik behandelt werden. Die Schwierigkeit bei diesen Messungen liegt darin, daß die Methylierungen in zellfreien Systemen sehr häufig nicht komplett sind. Neuere Untersuchungen von H. KERSTEN, H.J. ASCHHOFF und H.H. ARNOLD geben deutliche Hinweise dafür, daß tRNA-Methyltransferasen durch tRNAs selbst gehemmt werden. Diese Beobachtungen wurden inzwischen von anderen Arbeitsgruppen in Amerika (BOREK/KERR), in Japan (NISHIMURA), in Schweden (KEILIN, STRABY und BJÖRK) bestätigt. (Persönliche Mitteilungen dieser Autoren an H. und W. Kersten).

Eine komplette Methylierung von tRNAs in vitro läßt sich nur bei einem ganz bestimmten Verhältnis von tRNA zum Enzym erreichen und kann oft - und das ist für enzymatische Tests ungewöhnlich - einen Zeitraum von 48 Stunden benötigen. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, daß in den Rohextrakten, die die Enzyme enthalten, viele natürliche Inhibitoren der Methyltransferasen vorkommen, die die Reaktion bis zur Vollständigkeit blockieren können (KERR, 1970, HALPERN, 1971, GROSS und WILDENAUER, 1972). GROSS und WILDENAUER identifizierten in einer Methylasefraktion von Rattenleber Nicotinamid als einen natürlichen Inhibitor der in vitro Methylierung. Nicotinamid hemmt nicht die Methylase selbst, sondern stimuliert ein Enzym, das S-Adenosylmethionin spaltet. Folgende andere Faktoren können ebenfalls Ursache einer unvollständigen Methylierung sein:

Nicht optimale Konzentration von Stimulatoren, wie etwa Polyamine (Putrescin, Spermidin) oder Mg^{2+} und NH_4^+ -Ionen im Ansatz;

große Labilität einiger Methylasen, die während der Präparation der Extrakte oder während der Inkubation inaktiviert worden sein könnten;

in der Enzymfraktion enthaltenen Ribonukleasen, die während der langen Inkubationszeit einige tRNA-Moleküle degradieren könnten.

Nach Erfahrungen anderer Autoren können durch Erniedrigung des pH-Wertes im S 100 Überstand die natürlichen Inhibitoren der Methylasen zumindest partiell eliminiert werden. Dieses geschieht durch Präparation der sog. pH 5-Fraktion (vergleiche Material und Methoden). Auch die Versuche mit der pH 5-Fraktion, präpariert nach KERR oder nach STAEHELIN, schlugen fehl. Wir erhielten keinerlei Methylgruppentransfer. Optimale Ammonium- und Magnesium-Konzentrationen für das Testsystem wurden noch nicht ermittelt. Auch wurden keine Polyamine zugesetzt. Der Einfluß dieser Parameter auf in vitro Methylierungssysteme ist bekannt (KAYE und LEBOY, 1968, RODEH et al., 1967, ZELECNIK, 1967, LEBOY, 1971). KAYE und LEBOY betonen die Notwendigkeit, daß das Testsystem für jede Methylase- und jede Substratpräparation erneut bezüglich der Ionenkonzentration und der Konzentration an Polyaminen optimiert werden muß. Für alle diese Untersuchungen reichten die tRNA-Präparationen nicht aus.

In der folgenden Tabelle ist ein Vergleich unserer Ergebnisse mit denen von S.KERR (1970) gezeigt. Beide Tests wurden im homologen Säugetiersystem durchgeführt. In der Tabelle sind die Leerwerte ohne tRNA bereits subtrahiert worden. Wir arbeiteten wie Kerr ohne Zusatz von Polyaminen oder NH_4 -Ionen. Kerr findet bei einer Konzentration von aktiviertem Methionin von $10\text{ }\mu\text{Mol}$ im Ansatz, daß ca. ein Methylrest auf jedes tausendste tRNA-Molekül übertragen wird, wenn man die Relation zugrunde legt:
 $400\text{ }\mu\text{g tRNA} = 15\text{ nMol tRNA}$. In unseren Ergebnissen finden wir bei einer Konzentration von S-Adenosylmethionin im Ansatz von $100\text{ }\mu\text{Mol}$, daß ca. ein Methylrest im Fall der Kontroll-tRNA und ca. zwei im Falle der behandelten tRNA auf jedes hunderste tRNA-Molekül übertragen wird. Wir finden also eine etwa zehnfach stärkere Methylierung.

	S.Kerr (1970)	Wir (1971)
tRNA Quelle	Leber von erwachsenen Kaninchen	Leber von PA-behandelten erwachsenen Ratten
Methylasequelle	S100-Überstand von Leber Kaninchenfoeten	S100-Überstand von Leber erwachsener Ratten
Ansatzbedingungen (pro ml)	2.2 mg Enzym 400 µg tRNA 10 nMol 14 C-SAM Inkubation: 100' 37°C	2.0 mg Enzym 500 µg tRNA 100 nMol 14 C-SAM Inkubation: 120' 37°C
pMol CH_3 incorpориert	18.3	150 - 200

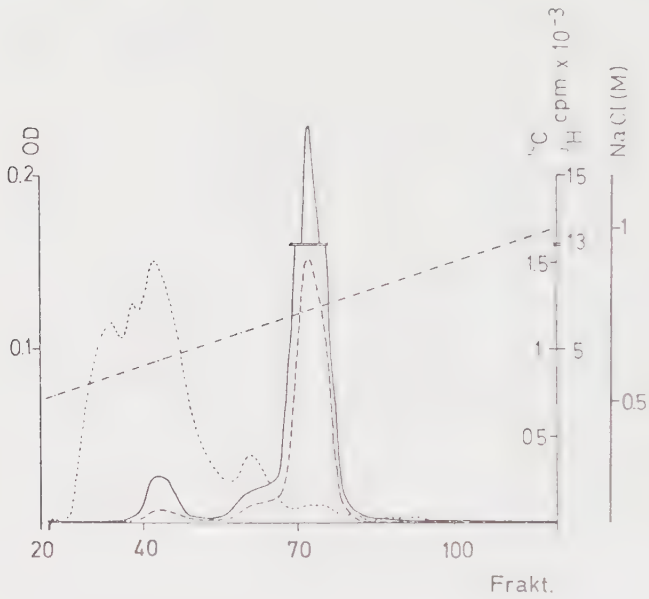
3.2.3.5 Das chromatographische Verhalten der tRNA

Von KERSTEN, WEHRLI und STAEHELIN (1970) wurde gezeigt, daß nach Behandlung von *B. subtilis* mit Pactamycin isoakzeptierende Spezies für tRNA^{Phe} auftreten. Neuerdings haben MANN und HUANG (1973) gezeigt, daß in *E. coli* nach Behandlung mit Chloramphenicol zahlreiche isoakzeptierende tRNA-Spezies auftreten. Daher stellten wir uns die Frage, ob auch nach Behandlung von Tieren mit Pactamycin die Rattenleber-tRNA isoakzeptierende Spezies zeigt. Wir studierten insbesondere das Verhalten von tRNA^{Phe} aus unbehandelten und mit 0,7 mg PA/kg behandelten Tieren auf einer Phasenumkehr-Säulenchromatographie nach PEARSON und KELMERS (1973). Bei diesem Experiment werden die zunächst deacylierten tRNA-Gemische mit radioaktivem Phenylalanin beladen (^3H und ^{14}C) und dann cochromatographiert wie beschrieben unter Material und Methoden. Auf diese Weise können mit Hilfe der Doppelmarkierung eventuelle chromatographische Unterschiede direkt erfaßt werden, da beide Präparate unter identischen Bedingungen chromatographiert werden.

Abbildung 18 zeigt das Elutionsprofil der Radioaktivität für phenylalanin-spezifische tRNA aus Leber. Die tRNA-Population

aus Kontrolltieren wurde mit ^{14}C -Phenylalanin beladen, die tRNA-Population aus behandelten Tieren mit ^3H -Phenylalanin. Erfahrungsgemäß zeigt das Elutionsprofil von normaler Rattenleber-tRNA_{Phe} zwei Gipfel (NISHIMURA und WEINSTEIN, 1969). Wir finden für das Material aus behandelten und aus unbehandelten Tieren das selbe Profil, das ebenfalls diese beiden Gipfel zeigt. Aus diesem Experiment ergibt sich keine Evidenz dafür, daß nach Einwirkung von Pactamycin neue isoakzeptierende tRNA-Spezies für Phenylalanin entstehen. Jedoch wäre es notwendig, weitere Serienversuche durchzuführen, bei denen die Tiere mit unterschiedlichen Dosen und über verschieden lange Zeiträume mit dem Antibiotikum behandelt werden müßten. Das chromatographische Resultat schließt die Möglichkeit von Isoakzeptoren jedoch nicht völlig aus. Es könnte eine Klasse von isoakzeptierenden tRNA_{Phe} vorkommen, die genau unter die beiden normalen Gipfel fielen. Im allgemeinen sprechen die Kelmers-Säulen auf Konformationsänderungen von tRNA-Molekülen gut an, und isoakzeptierende Moleküle werden auch getrennt.

Abb. 18: Cochromatographie phenylalanin-spezifischer tRNAs.



..... $\text{OD}_{260 \text{ nm}}$

———— tRNA von unbehandelten Tieren, mit ^{14}C -Phenylalanin beladen

- - - - tRNA von behandelten Tieren, mit ^3H -Phenylalanin beladen

4. ZUSAMMENFASSUNG DER WICHTIGSTEN RESULTATE DER ARBEIT

Pactamycin ist ein Antibiotikum, das in Prokaryonten und Eukaryonten die Proteinbiosynthese hemmt. Der Wirkungsmechanismus von Pactamycin wurde bisher vorwiegend an Mikroorganismen und mit zellfreien Systemen der Proteinbiosynthese aus Mikroorganismen untersucht. Diese Arbeit hatte zum Ziel herauszufinden, ob nach Behandlung von Ratten mit verschiedenen Dosen des Antibiotikums ähnlich wie bei Mikroorganismen die Zellkomponenten verändert sind, die an der Proteinbiosynthese teilnehmen. Es wurden untersucht die Ribosomen und die Transferribonucleinsäuren aus Rattenleber nach Behandlung der Tiere mit Pactamycin.

Folgende Resultate wurden erhalten:

a) Ribosomen

Die Ribosomen aus der Leber von behandelten Tieren erwiesen sich bis zu 60% weniger aktiv in einem zellfreien System der Peptidsynthese mit Transferribonucleinsäuren und Überstandsenzymen aus Kontrolltieren als die Ribosomen aus unbehandelten Tieren. Sowohl unter Verwendung von endogener mRNA als auch von Poly U wurde eine stark verminderte Aktivität im zellfreien System der Peptidsynthese gefunden nach Behandlung der Tiere mit einer mittleren Hemmdosis (0.4 mg pro kg Körpergewicht). Die verminderte Aktivität der Ribosomenpräparation aus behandelten Tieren konnte erklärt werden. Die Untersuchungen der Ribosomenpräparation aus behandelten Tieren zeigte im Vergleich zu entsprechenden Ribosomenpräparationen aus Kontrolltieren im Saccharosegradienten einen hohen Gehalt an ribosomalen Untereinheiten und einen verminderten Gehalt an Polysomen. Der Polysomenabbau ist eine typische Folge der Hemmung der Initiation der Proteinbiosynthese und ist von anderen Autoren für Pactamycin auch bei Mikroorganismen und in Zellkulturen nach Behandlung mit Pactamycin beobachtet worden.

b) Transfer-Ribonucleinsäuren

In Mikroorganismen steigen nach Behandlung mit niedrigen Dosen von Hemmstoffen der Proteinbiosynthese die RNA Gehalte an, der Einbau von radioaktiven Vorstufen in Ribonucleinsäuren nimmt zu und die Ausbeute von RNA aus behandelten Mikroorganismen kann gegenüber entsprechenden Kontrollen um das zwei- bis dreifache erhöht sein.

Auffallend war, daß auch die Ausbeuten an tRNA aus Rattenleber behandelter Tiere mit der Hemmstoffdosis streng korreliert zunahmen. Aus den Rattenlebern der Tiere, die mit der höchsten Dosis behandelt wurden, konnte bis zu 3 mal mehr tRNA gewonnen werden als aus entsprechenden Kontrollen.

Die tRNA Präparate aus behandelten Tieren zeigten ^{nahezu} in allen Fällen optimale Akzeptorfähigkeit für Aminosäuren in einem in vitro Test mit Enzymen aus Kontrolltieren.

Während jedoch für phenylalaninspezifische tRNA aus mit Pactamycin behandelten Mikroorganismen isoakzeptierende tRNA species auftreten, konnte ~~für~~ das phenylalaninspezifische tRNA aus Rattenleber nach Behandlung der Tiere mit Pactamycin in keinem Fall nachgewiesen werden.

Einige Resultate sprechen dafür, daß die tRNA Präparate aus behandelten Tieren in einem zellfreien System der Methylierung mit Enzymen aus Kontrolltieren mehr Methylgruppen akzeptieren als die tRNA Präparate aus Kontrolltieren. Dieser Befund könnte ein Indiz dafür sein, daß Pactamycin bei höheren Organismen wie in Mikroorganismen die Transkription und die nachfolgende Modifikation der tRNAs hemmen kann.

Bisher gibt es keine methyldefizienten tRNAs aus Eukaryonten. Diese wären ein wichtiges Hilfsmittel zur Messung von tRNA Methyltransferaseaktivitäten in Tumoren. Gegenüber methylgruppendifizienten tRNAs aus Mikroorganismen wurde für zahlreiche Tumoren eine erhöhte tRNA Methyltransferaseaktivität gefunden. Die Resultate dieser Arbeit sind ein erster Hinweis dafür, daß sich Hemmstoffe der Proteinbiosynthese verwenden lassen, methylgruppendifiziente tRNAs aus Eukaryonten zu gewinnen.

5. LITERATUR

ARNOLD H.H., and H.KERSTEN

FEBS Letters 36, 34 (1973)

ARONSON A.I. and S.SPIEGELMANN

BBA 53, 70 (1961)

AVITAL S. and ELSON D.

BBA 179, 297 (1969)

BIEZUNSKI N., D.GIREON, U.Z.LITTAUER

BBA 199, 382 (1970)

BHUYAN B.K. (1965 a)

(1965 b)

unpublizierte Ergebnisse, in "The Antibiotics", Gottlieb and Shaw Edts. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967 zitiert.

BHUYAN B.K.

Biochem. Pharmacol. 16, 1411 (1967)

BOREK E. and S.J.KERR

Cancer Research 15, 163 (1972)

BOREK E. and STRINIVASAN P.R.

Ann. Rev. Biochem. 35, 275 (1966)

BRUNNGRABER E.F.

B.B. Res. Commun. 8, 1 (1962)

COHEN L.B., A.E. HERNER and I.H.GOLDBERG

Biochemistry 8, 1312 (1969)

COLOMBO B., L. FELICETTI and C.BAGLIONI

BBA 119, 109 (1966)

CRADDOCK V.M.

Nature 228, 1264 (1970)

DAGLEY S., A.E. WHITE, D.G. WILD and J.SYKES

Nature 4823, 25 (1962)

DARNELL J.E.

Bacteriol. Rev. 32, 262 (1968)

DELIHAS N. and M. STAHELIN

BBA 119, 385 (1966)

DUBIN D.T. and A.GRUNALP

BBA 134, 106 (1967)

EMMERICH B., B. GOERTZ and H. KERSTEN

FEBS Letters 21, 244 (1972)

ENNIS H.L.

Mol. Pharmacol. 2, 501 (1966)

EVANS A.M. et al (1965)

in "Antibiotics", I, Gottlieb and Shaw Edts, Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York (1967) zitiert.

FELICETTI L., B. COLOMBO and C. BAGLIONI

BBA 119, 120 (1966)

GALE E.F., E. CUNDLIFFE, P.E. REYNOLDS, M.H. RICHMOND and M.S.WARING

"The Molecular Basis of Antibiotic Action", WILEY and SONS Edts.,
London, N.Y., Sydney, Toronto (1972)

GOERTZ B., B. EMMERICH and W.KERSTEN

H.-S.Z. Physiol. Chem. 353, 793 (1972)

GROSS H.J. and D. WILDENAUER

B.B. Res. Commun. 48, 58 (1972)

HAHN F.

in "Antibiotics", Gottlieb and Shaw Edts, Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, N.Y. (1967)

HALPERN R.M., S.Q. CHANEY, B.C. HALPERN and R.A. SMITH

B.B. Res. Commun. 42, 602 (1971)

HOLLAND J.J.

Proc. Nat. Acad. Sci. US 50, 436 (1963)

HOLLEY R.W.

B.B.Res. Commun. 10, 186 (1963)

HOSOKAWA H. and M. NOMURA

J. Mol. Biol. 12, 225 (1965)

HURWITZ J., M. COLD, M. ANDERS

J. Biol. Chem. 239, 3462 (1964)

KAEMPFFER R. and M. MESELSOHN

Cold Spr. Harb. Symp. 34, 209 (1969)

KAPPEN L.S., H. SUZUKI, I.H. GOLDBERG

Proc. Nat. Acad. Sci. US 70, 22 (1973)

KAYE A.M. and P.S. Leboy

BBA 157, 289 (1968)

KERR S.J.

Biochemistry 9, 690 (1970)

KERSTEN H.

Progr. Mol. Submol. Biol. 2, 58 (1971)

KERSTEN H., P. CHANDRA, W. TANCK, W. WIEDEMHOVER and W. KERSTEN

H.-S. Z. Physiol. Chem. 349, 659 (1968)

KERSTEN H., W. KERSTEN, B. EMMERICH and P. CHANDRA

H.-S. Z. Physiol. Chem. 348, 1424 (1967)

KERSTEN H. und H. LINKEMANN

Zentralblatt Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene 212, 233 (1969)

KIRBY

Progr. Nucleic Acid Res. 3, 1 (1964)

KIRBY

Methods in Enzymology. XII B, Grossman and Moldave Eds, Academic Press, New York-London (1968)

KURLAND C.G.

Science 169, 1171 (1970)

LATHAM H. and J.E. DARNELL

J. Mol. Biol. 14, 13 (1965)

LAZZARINI R.A. and A. PETERKOFISKY

Proc. Nat. Acad. Sci. US 53, 549 (1965)

LEBOY P.S.

FEBS Letters 16, 117 (1971)

LESLIE I.

"The Nucleic Acids" Band II, Chargaff and Davidson Eds.
Academic Press, New York (1955)

LITTAUER U.Z., K. MUENCH, P. BERG, W. GILBERT and P.F. SPAHR

Cold Sp. Harb. Symp. 28, 157 (1963)

LODISH H.F., D. HOUSMAN, M. JACOBSEN

Biochemistry 10, 2348 (1971)

MACDONALD J.S. and I.H. GOLDBERG

B.B. Res. Commun. 41, 1 (1970)

MANDAL R.K.

BBA 182, 375 (1969)

MANDEL L.R. and E. BOREK

Biochemistry 2, 560 (1963)

MANN M.B. and P.C. HUANG

Biochemistry 12, 5289 (1973)

MANS R.J. and G.D. NOVELLI

B.B. Res. Commun. 3, 540 (1960)

MUNRO A.J., R.J. JACKSON and A. KORNER

Biochem. J. 92, 289 (1964)

NAKADA D.

BBA 103, 455 (1965)

NISHIMURA S. and I.B. WEINSTEIN

Biochemistry 8, 832 (1969)

NOLL H.

in Techniques in Protein Biosynthesis, II, Campbell and Sargent
Eds., Academic Press, London-New York (1969)

NOMURA M.

Fed. Proc. 31, 18 (1972)

OGILVIE A., K. WIEBAUER, H. KERSTEN

unveröffentlichte Ergebnisse (1974)

PEARSON R.L., C.W.HANCHER, J.F.WEISS, D.W.HOLLADAY and A.D.KELMERS

BBA 294, 236 (1973)

PETERKOFISKY A., C.JERSENSKY, A.BANK and A.MEHLER

J.Biol. Chem. 239, 2918 (1964)

REVEL M. and U.Z.LITTAUER

B.B. Res. Commun. 20, 187 (1965)

RODEH R., M.FELDMAN and U.Z.LITTAUER

Biochemistry 6, 451 (1967)

SEIN K.T., A.BECAREVIC and D.KANAZIR

Anal. Biochem. 28, 65 (1969)

SELLS B.H.

BBA 80, 230 (1964)

SHARMA O.K., S.J.KERR, R.LIPSHITZ-WIESNER and E.BOREK

Feder. Proceed. 30, 167 (1971)

SHATKIN A.J.

"Fundamental Techniques in Virology", Habel and Salzman Eds,
Academic Press New York and London (1969)

SHUGART L., G.D.NOVELLI, M.P.STULBERG

BBA 157, 83 (1968)

Skriptum über zellfreie Proteinsynthese

Aarhus-Kursus (1972)

SMITH D.W. and A.L. McNAMARA

Science 171, 577 (1971)

SOEIRO R., M.H.VAUGHAN and J.E.DARNELL
J. Chem. Biol. 36, 91 (1968)

SOWAKA Y. and Y. KAZIRO
B.B.Res. Commun. 33, 108 (1968)
B.B.Res. Commun. 34, 99 (1969)

STAEBELIN T. and A.K.FALVEY
J. Mol. Biol. 53, 1 (1971)

STARR J.L.
Res. Commun. 10, 181 (1963)

STEWART-BLAIR M.L., I.S.YANOWITZ and I.H.GOLDBERG
Biochemistry 10, 4198 (1971)

TAI P.C., WALLACE B.J. and DAVIS B.D.
Biochemistry 12, 616 (1973)

TAMAOKI T. and G.MUELLER
B.B.Res. Commun. 11, 404 (1963)

WARNER J.R., M.GIRARD, H.LATHAM and J.E.DARNELL
JMB 19, 373 (1966)

WATSON J.D.
"Molecular Biology of the Gene" Benjamin, Inc. New York (1970)

WILLEMS M., M.PENMAN and S.PENMAN
JCB 41, 177 (1969)

YANG W.K. und G.D.NOVELLI
B.B.Res. Commun. 31, 534 (1968)

YANG W.K., and G.D.NOVELLI
"Methods in Enzym." II, Moldave and Grossman Edits.,
Academic Press New York and London (1971)

ZAHN R.K.
"Biochemisches Taschenbuch" Rauen, Band II, Springer Verlag
Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York (1964)

ZELENZNICK L.D.

Arch. Bioch. Biophys. 118, 133 (1967)

ZOMZELY-NEURATH C.E.

"Methods in Molecular Biology", II, Last and Laskin Edts.,
Marcel Dekker, New York (1972)

Lebenslauf

- 14.4.43 Geboren in Avignon (Frankreich) als erstes von drei Kindern;
Vater: Dr.med., Dr. es Science André François Reymond
Mutter: Claude Reymond, geborene Labeyrie.
- 1949-1956 Besuch der Volksschulen in Paris und in Rabat (Marokko)
- 1956-1963 Besuch der Gymnasien "Collège sévigné" und "Lycée Fénelon" in Paris
- 9.7.1963 Abitur in Paris
- Okt. 1963 bis Juli 1964 Studium der Biologie (Vorbereitungsjahr) an der Universität Paris
- Okt. 1964 bis Juli 1965 Fortsetzung des Studiums der Biologie an der Universität Tunis (Tunesien)
- Okt. 1965 bis Okt. 1968 Fortsetzung des Studiums der Biologie an der naturwissenschaftlichen Fakultät Orsay der Universität Paris
- Okt. 1968 Prüfung für die "Licence es Sciences Naturelles" in den Fächern: Zoologie, Botanik, Tierphysiologie, Paläontologie, Geologie
- Okt. 1968 bis März 1969 Besuch des Deutschkurses für Ausländer an dem Akademischen Auslandsamt der Universität Münster

Mai 1969 bis Jan. 1971	Studium der Biologie an der Universität Erlangen-Nürnberg und Vorbereitung der Diplom-Hauptprüfung für Biologie
2.5.1970	Eheschließung mit Herrn G. Fey, Diplom-Physiker
10.2.1971	Diplom-Hauptprüfung für Biologie in den Fächern: Zoologie, Botanik, Paläontologie, Geologie
März 1971 bis Mai 1973	Wissenschaftliche Hilfskraft am Physio- logisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg und Doktorandin bei Frau Professor Dr. H. Kersten.

Druck: HOGL Erlangen